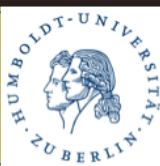


Proceedings in Marine Biology

Journal of the Graduate Course on Electron Microscopy
of the Humboldt-Universität zu Berlin

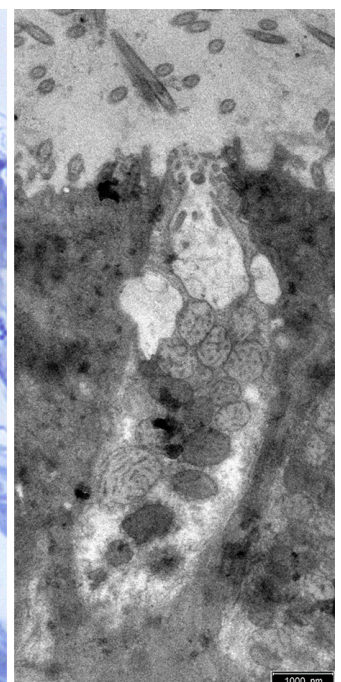
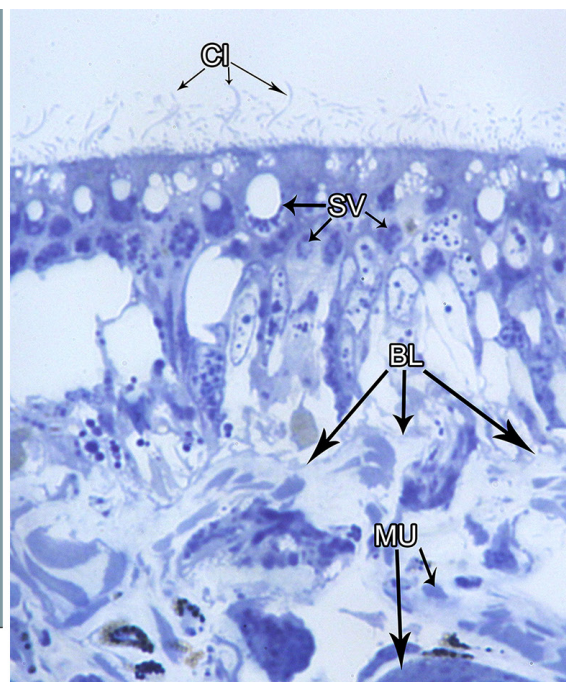
Volume 2 Number 4 2018



Jost, J., Rachel, F.: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Epidermis von *Pomatias elegans*. **1-11**

Gäde, M., Körner, S.: Ultrastruktur des Epithels von *Viviparus viviparus*. **12-23**

al Jalali, L., Segelitz, P. S.: Ultrastrukturvergleich der Epidermisstruktur von terrestrischen (*Pomatias elegans*), Süßwasser- (*Viviparus viviparus*) und marinen (*Steromphala divaricata*) Gastropoden. **24-41**



“Proceedings in Marine Biology” is an international journal publishing original research by graduate students on all aspects of marine biology. Subjects covered include: ecological surveys and population studies of oceanic, coastal and shore communities; physiology and experimental biology; taxonomy, morphology and life history of marine animals and plants. Papers are also published on techniques employed at sea for sampling, recording, capture and observation of marine organisms.

Editorial Board

T. Stach

Elektronenmikroskopie

Humboldt-Universität zu Berlin

Berlin

Germany

thomas.stach@hu-berlin.de

P. Martin

Elektronenmikroskopie

Humboldt-Universität zu Berlin

Berlin

Germany

peer.martin@biologie.hu-berlin.de

Instructions to authors.

Manuscripts submitted to “Proceedings in Marine Biology” must be original, not under consideration elsewhere. Papers should be written in clear English, German, or Low German with an abstract in English. Acronyms must be written in full on their first occurrence and SI units must be used. Scientific names should be italicized.

Manuscripts should be arranged in the following order:

Title, Author(s), Address(es), Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, References, Figures, Captions, and Tables.

Submission.

Please submit all manuscripts for review by e-mail, postal service, or personally as plain word files to the editors.

Preparation.

“Proceedings in Marine Biology” invites contributions as:

- 1. Full Research Articles of not more than 10 printed pages including tables and illustrations (10,000 words+ figures + tables).*
- 2. Short Papers of not more than 3000 words (+2 figures & 2 tables, or 4 figures or 4 tables etc.)*
- 3. Short Communications of not more than 2 printed pages including table and illustration (1500 words + 1 figure & 1 table, or 2 figures or 2 tables). These papers must start with an Abstract but are not otherwise divided into sections.*

E-mail.

Please provide an e-mail address for the first or corresponding author. This will appear on the title page of each article.

Title.

The title should be no more than 20 words.

Abstract.

A concise informative abstract of not more than 250 words should summarize the most important findings.

Tables.

Tables should not be excessive in size and headed by informative legends. Legend, headings and foot-note are delimited by horizontal lines. Data sheets and tables deemed necessary might accompany the manuscript and be added as appendices in an electronical supplement.

Citation of literature.

References in the text should refer to the authors name and year of publication. Two authors should be cited using '&' (Rainbow & Dellinger, 1993); for more than two authors, the name of the first author followed by 'et al.' (Lallier et al., 1987). When citing more than one publication use a semi-colon to separate the different authors e.g. (Gorind et al., 1997; Mykels & Skinner, 1985a,b; Skinner, 1996). The manuscript should be carefully checked to ensure the details of authors and dates cited in the text exactly match those in the reference list. Cross checking of references in the text to the cited literature and vice versa is the responsibility of the author.

All literature quoted in the text must be listed in alphabetical and chronological order of author names at the end of each manuscript. When more than one publication with the same first author(s) is cited the following order alphabetically applies: (a) single author, according to publication dates; (b) same author and one co-author; (c) same author and more than one co-author. Titles of journals must be written in full and references to books should include the place of publication and the publisher. Examples:

Journals.

Marshall, S.M., Nicholls, A.G. & Orr, A.P. (1939): On the growth and feeding of young herring in the Clyde. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 2: 427–455.

Books.

Cushing, D.H. (1981): Fisheries biology, a study in population dynamics, 2nd ed. Madison: University of Wisconsin Press.

Chapters from books.

Weir, B.S. (1990): Intraspecific differentiation. In: Molecular systematics (ed. D.M. Hillis and C. Moritz), pp. 373–410. Sunderland: Sinauer Associates.

Processing.

Manuscripts will be critically reviewed by at least one referee. Subject to suitable review, papers may be selected for publication by the editors. Acceptable papers will be returned to the author for revision and editorial corrections.

Revision.

Revised manuscripts must be returned electronically or on CD. Any Word formats are suitable for text.

Figures.

Figures must be submitted as PC compatible TIFF files. These must be of 300 dpi resolution. All figures should be labelled with a medium weight sans serif font of an appropriate size to result in 8 point type when reduced to a single column width. If figures are in parts, please label A, B, C, D, etc. in top left corner of each part.

Proofs.

The first or corresponding author will receive the proofs, which will be supplied as word or pdf files.

Reprints.

A CD with the final version of the manuscript will be provided to the authors free of charge.

This special volume deals exclusively with the results of the
laboratory course on methods in electron microscopy at
the Humboldt-Universität zu Berlin (Germany)

from 17.04. - 12.05.2018

Participants:

al Jalali, Leonor	<jalalile@hu-berlin.de>
Gäde, Mario	<m.gaede@gmx.net>
Jost, Jenny	<jostjenn@hu-berlin.de>
Körner, Sandra	<sandra_koerner@gmx.net>
Martin, Peer	<peer.martin@biologie.hu-berlin.de>
Rachel, Franziska	<franziska.rachel@student.hu-berlin.de>
Segelitz, Patrick Steven	<Patrick.Segelitz@gmx.de>
Stach, Thomas	<thomas.stach@hu-berlin.de>

Elektronenmikroskopische Untersuchung der Epidermis von *Pomatias elegans*

Jost, Jenny; jostjenn@hu-berlin.de

Rachel, Franziska; franziska.rachel@student.hu-berlin.de

Abstract

The round-mouthed snail *Pomatias elegans* is a terrestrial gastropod, which belongs to the subclass Prosobranchia and is widely distributed in Europe and in the Black Sea region. This study aims to describe in detail the fine structure of the epidermis on a morphological level using three different microscopical methods (light microscopy, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy). We investigated the proximal part of a tentacle of *P. elegans* to show the single layered epithelium with individual mucus producing goblet cells. The present results highlight that epithelium cells are covered by a microvilli border with a glycocalyx network on top. In addition, our analyses demonstrated the absence of cilia in this epidermal region of *P. elegans* contrary to previous reports in the literature and different from results in other species of prosobranch marine and fresh water snails investigated by colleagues in the same Master's course.

Einleitung

Gastropoda (Schnecken) gehören zum Stamm der Mollusca (Weichtiere), dem zweitgrößten Tierstamm nach Arthropoda (wikipedia-Schnecken, 2018; Richling & Groh, 2017). Schnecken kommen unter anderem an Land vor (Richling & Groh, 2017). Die meisten von ihnen, so wie *Pomatias elegans* (O.F. Müller 1774) (= *Cyclostoma elegans*) (Mizzaro-Wimmer, et al., 2001), besitzen ein Gehäuse (Richling & Groh, 2017; Mizzaro-Wimmer, et al., 2001).

P. elegans (Schöne Landdeckelschnecke, red-mouthed snail, round-mouthed snail (Cole, 2017), Familie Pomatiidae) (Abbildung 1) kommt in Europa und isoliert im Schwarzmeerraum vor (Richling & Groh, 2017). Sie können eine Größe von bis zu 15 mm erreichen und, im Gegensatz zu anderen in Deutschland vorkommenden Schnecken, „schreiten“ sie, aufgrund einer Längsfurche in der Fußsohle (Richling & Groh, 2017; Mizzaro-Wimmer, et al., 2001). Sie sind dunkelbraun gefärbt mit hellen Punkten (Mizzaro-Wimmer, et al., 2001). Des Weiteren besitzen sie am abgeflacht-breiten Kopf zwei kurze und fast schwarze Tentakel (Mizzaro-Wimmer, et al., 2001). Die Epidermis der Tiere (Unterklasse Prosobranchia) ist einschichtig und besteht in der Grundstruktur aus drei Zellarten die in

ihrer Anzahl variieren, so dass das Epithel je nach Lage im Tier etwas anders aussehen kann (Harrison, et al., 1994).



Abb.1. Lebende Schöne Landdeckelschnecke (*Pomatias elegans*), die sich in ihr Gehäuse zurückgezogen hat. Das Operculum (der hornige Deckel) ist verschlossen.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde die Epidermis der Tentakel dieser Schneckenart untersucht. Hierbei kamen verschiedene optische Verfahren zum Einsatz. Die Struktur der Tentakelepidermis wurde vor allem mit Hilfe der Elektronenmikroskopie (Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie) betrachtet.

Material & Methoden

Für die folgenden Untersuchungen wurden Gewebeproben (insbesondere der Bereich der Tentakel und vom Fuß) von Exemplaren der Schnecke *P. elegans* (Herkunft: Kroatien) verwendet und für die Elektronenmikroskopie unter Anleitung des vorliegenden Kursprotokolls (Stach & Martin, 2018) vorbereitet. Zunächst wurden die Proben einer chemischen Fixierung unterzogen, um den Erhalt der Morphologie innerhalb des Gewebes ohne optische Veränderung zu gewährleisten. Es erfolgte eine 40-minütige Primärfixierung mit Glutaraldehyd (2,5 % Glutaraldehyd, 2 % Paraformaldehyd mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0) bei Raumtemperatur, ein anschließendes 5-minütiges Waschen in der Pufferlösung (pH 6,8), sowie eine Sekundärfixierung mit Osmium (2 % Osmiumtetroxid im Phosphatpuffer pH 6,8, 30 min.) auf Eis. Da Proben für die Elektronenmikroskopie nur wasserfrei verwendet werden können, wurde eine Entwässerung mit einer Alkoholreihe (aufsteigend von 30 % bis 100 % Ethanol, jeweils 10 min.) durchgeführt.

Die Präparate für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurden einer „Kritisch Punkt“-Trocknung (CPD 030, Bal-tec) unterzogen, wobei der absolute Alkohol im Präparat mit flüssigem CO₂ ausgetauscht wurde und über dem kritischen Punkt (Punkt an dem die Phasengrenze zwischen flüssig zu gasförmig nicht mehr existiert, da die Dichten der beiden Zustandsformen gleich sind) entweicht. Es erfolgte eine Be-

Weitere Schneckenarten wurden innerhalb des Kurses bezüglich der epidermalen Struktur der marinen Schnecke *Steromphala divaricata* (Linnaeus, 1758) sowie der Sumpfdickelschnecke *Viviparus viviparus* (Linnaeus, 1758) untersucht.

schichtung der REM-Präparate mittels einem „Sputter coater“ (Bal-tec) mit Goldpartikeln (120 s, 30 mA; ca. 30 nm Schichtdicke) welche davor auf einem „stub“ (Objektträger) aufgeklebt wurden. Abschließend konnten diese im Rasterelektronenmikroskop (LEO 1430, Zeiss) untersucht werden.

Die Präparate für das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) wurden nach der Entwässerung mit Propylenoxid (2x 10 min.) behandelt und in Epoxidharz (Araldit; Araldite 502 Kit EMS #13900) eingebettet. Dies erfolgte über einen schrittweisen Austausch von Propylenoxid mit Araldit A (23,0 g Araldite CY 212, 22,0 g Dodeceny succinicanhydride) in den Verhältnissen 3:1 (2 h), 2:1 (2 h), 1:1 (2 h), 1:2 (über Nacht), 1:3 (2,5 h) hin zu reinem Araldit A (1x über Nacht, 1x 2h). Anschließend wurde das Araldit A direkt mit reinem Araldit B (23,0 g Araldite CY 212, 22,0 g Dodeceny succinicanhydride, 1,2 g Benzyl dimethylamine) ausgetauscht (2,5 h). Für die Einbettung in Gussförmchen wurde ebenfalls Araldit B verwendet. Die Aushärtung der TEM-Präparate erfolgte bei +60°C im Wärmeschrank über das Wochenende (Abbildung 2).

Die Objektträger „grids“, für die Ultradünnschnitte (TEM), wurden mit einer Trägerfolie (Formvar = Polyvinylformaldehyd) befilmt. Glasmesser für das Trimmen und Herstellen der Schnitte wurden angefertigt (Reichert Knifemaker). Das eingebettete TEM-Präparat wurde mittels Rasierklinge und Glasmesser getrimmt, um eine trapezförmige Anschnittfläche zu erhalten. Die Semidünnschnitt- und Ultradünnschnitte wurden mit einem Ultramikrotom gefertigt (Reichert Ultracut S). Zunächst wurden Semidünnschnitte (1 µm) hergestellt, mit Hilfe einer Platinöse auf einen Objektträger übertragen und mit Toluidinblau (2 %) gefärbt, um diese unter dem Lichtmikroskop zu untersuchen. Die Ultradünnschnitte (60-70 nm) wurden mittels Glasmesser und teilweise mit Hilfe eines Diamantmessers geschnitten und auf die präparierten Grids übertragen. Es erfolgte eine Kontrastierung der Schnittpräparate auf den Grids mit Uranylacetat (4 % Lösung, 20 min.) und Bleicitrat (5 min.). Abschließend wurden die kontrastierten Ultradünnschnitte auf den Grids mit dem TEM (EM900, Zeiss) betrachtet.

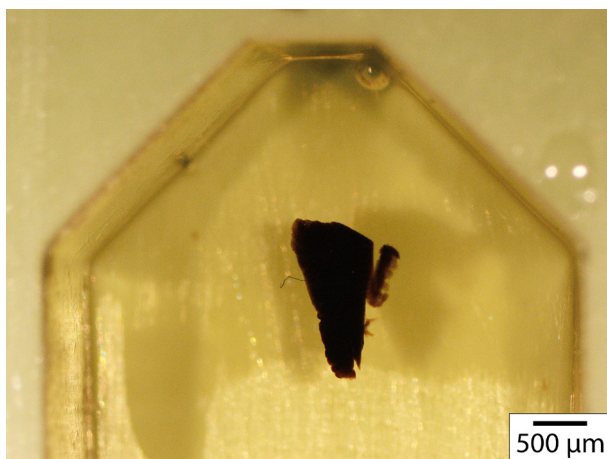


Abb.2. Für die Elektronenmikroskopie in Epoxidharz eingebettete Tentakelspitze von *Pomatias elegans*.

Ergebnisse

Rasterelektronenmikroskopie (REM):

Die Gesamtaufnahme der Tentakel zeigt eine spitz zulaufende konische Form (Abbildung 3A), die an ihrer relativ glatten Oberfläche Furchen aufweist, welche mehr oder weniger regelmäßig angeordnet sind (Abb. 3A - C). Diese Furchen verlaufen ringförmig um das gesamte Tentakelgewebe (Abb. 3A) und gehen „reißverschlussartig“ ineinander

über (Abb. 3C und D). In der Mitte dieser Zone sind dunklere, rissähnliche Bereiche zu sehen (Abb. 3D und E), die sich bei näherer Betrachtung (Abb. 3F) als kompakt stehende längliche Strukturen mit unebener Oberfläche herausstellten. Diese Strukturen verzweigen sich fein nach oben und bilden ein Netzwerk. Sie sind am ehesten als Mikrovilli mit einem aufliegenden Netzwerk aus Glykokalyx zu deuten.

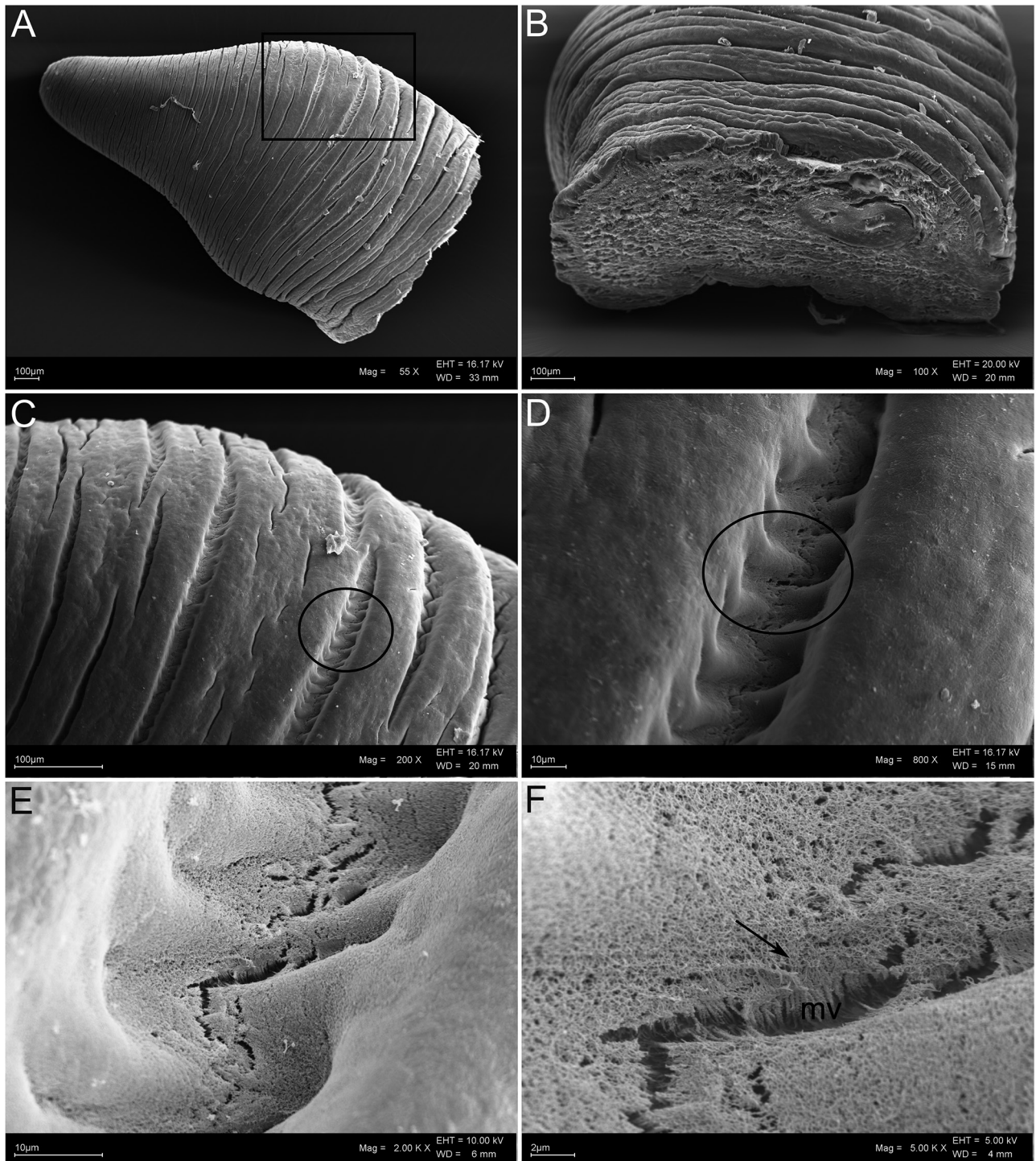


Abb.3. Präparat der Tentakel von *P. elegans*. REM. **A** zeigt die Gesamtaufnahme des Untersuchungsobjektes. **B** zeigt die proximale Seite der Tentakel mit einer Einsicht in die inneren Strukturen und **C-F** die schrittweise Vergrößerungen der Oberfläche (Rechteck) der Tentakel. **C** stellt die „reißverschlussförmige“ Einfaltungen (Kreise) der Oberfläche dar. **F** zeigt Mikrovilli (**mv**) mit darüberliegendem Glykokalyx (Pfeil).

Die Aufnahmen vom Tentakelquerschnitt zeigen einen mehrschichtigen Aufbau (Abb. 3B). Die Epithelzellen stehen pallisadenähnlich parallel nebeneinander (Abb. 4 A und C) mit einer Länge von ca. $33\text{ }\mu\text{m}$ und einem Durchmesser von ca. $2\text{ }\mu\text{m}$. Die Tentakelepipithelzellen werden basal durch eine flächige und sehr dünne Basalmembran (Abb. 4A und C) von dem darunterliegenden Gewebe getrennt. Dieses basal liegende Gewebe besteht aus dicht

gepackten Fasern, die einen Durchmesser von ca. $1\text{ }\mu\text{m}$ aufweisen und in unterschiedliche Richtungen (Abb. 4A) verlaufen. Die Epithelzellen zeigen eine deutliche Schichtung (Abb. 4B - E). Im basalen Bereich der Epithelzellen ist ein länglich ovaler Hohlraum von etwa $8 - 9\text{ }\mu\text{m}$ Länge und ca. $1\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser zu erkennen (Abb. 4B und C). Hierbei handelt es sich vermutlich um beim Querschnitt verloren gegangene Zellkerne. Im apikalen Bereich der

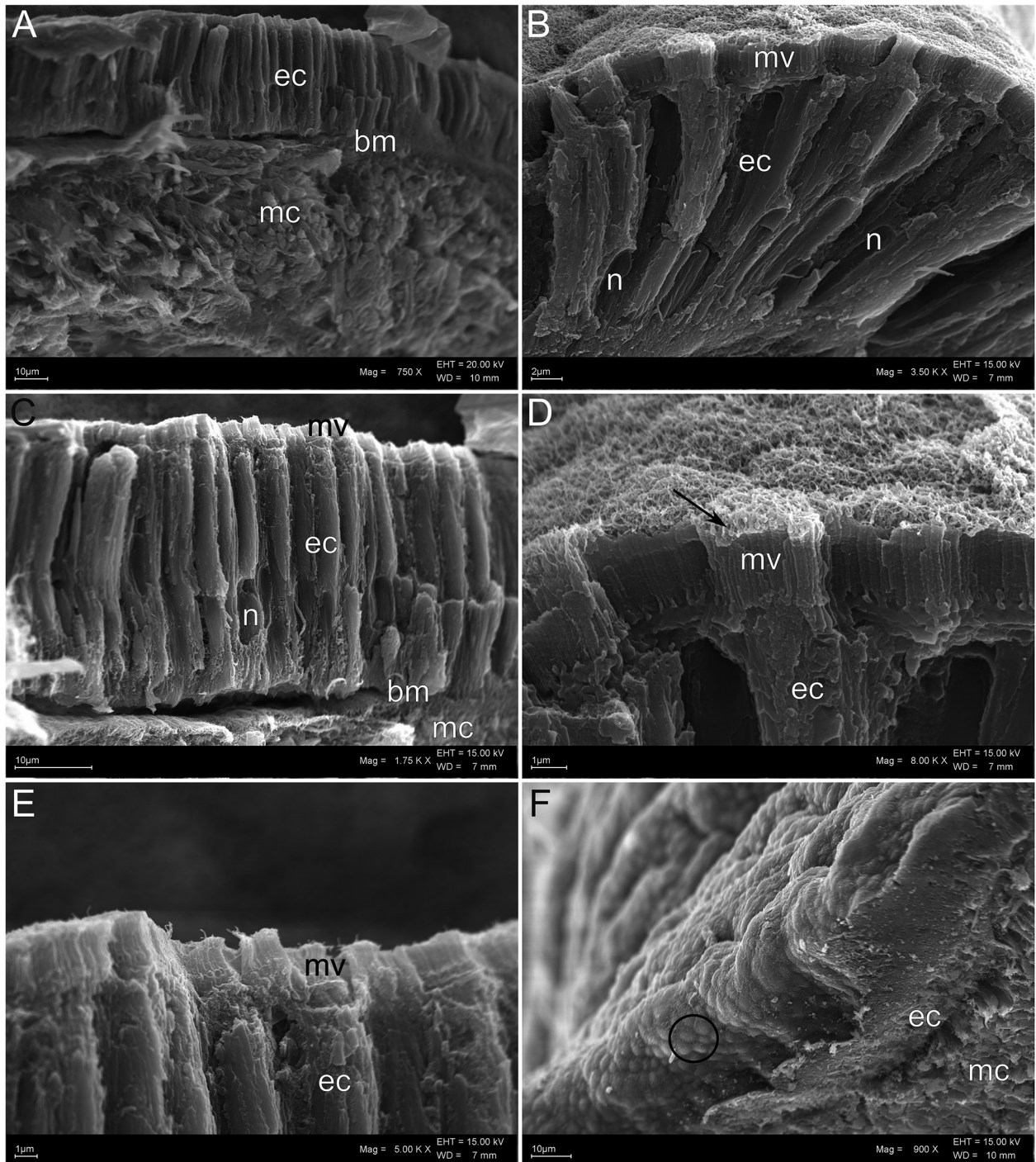


Abb.4. Querschnittsfläche der Tentakel von *P. elegans*. REM. Die abgebildete Epidermis besteht aus dem Epithel (ec) mit Mikrovilli (mv) und aufgelagerter Glykokalyx (Pfeil). Darunter schließt sich eine Muskelschicht (mf) an. Die Aufnahmen A-E zeigen eine zunehmende Vergrößerung der Epidermis. F zeigt die kompakt stehenden Mikrovilli mit der aufgelagerten Glykokalyx und der Kreis zeigt die Erhebungen, welche die Zellgrenzen der Epithelzellen an der Oberfläche widerspiegeln. n Nucleus, bm Basalmembran.

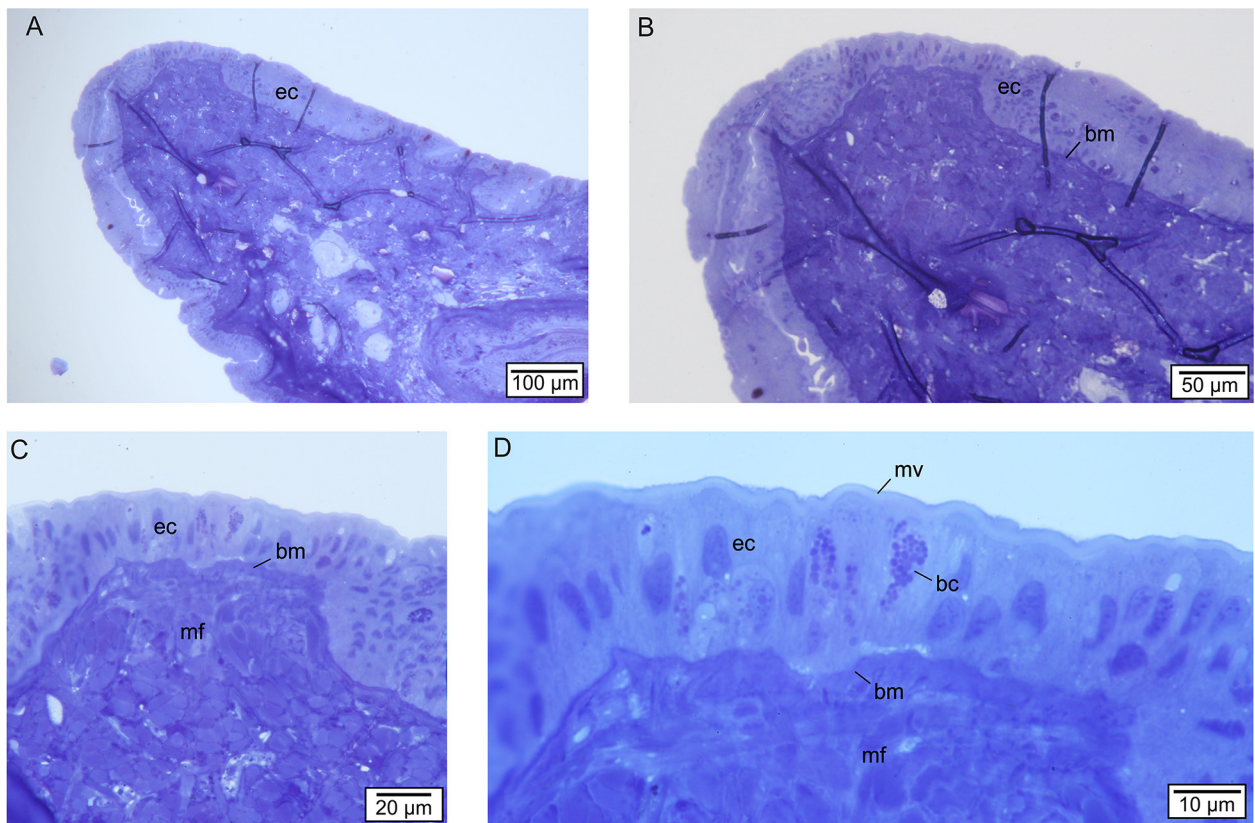


Abb.5. Lichtmikroskopische Aufnahmen der Tentakel von *P. elegans*, angefärbt mit Toluidinblau. **A** zeigt eine Gesamtansicht des Semidünnschnittes. **B-D** zeigen weitere Vergrößerungen des Gewebes. Deutlich zu erkennen ist das hell gefärbte Epithel (**ec**). Basal davon befindet sich die dunkler gefärbte Basalmembran (**bm**) und das Geflecht aus Muskelfaserbündeln (**mf**). Nach außen wird das Epithel von einem Mikrovillisaum (**mv**) abgegrenzt. Becherzellen (**bc**) sind vereinzelt im Epithel vorhanden.

Tentakelepithelzellen ist ein dichtstehender Bürstensaum (Abb. 4B - E) zu erkennen, der eine Höhe von ca. 1,5 - 2 μm misst und sich nach außen durch eine kompakte Glykokalyxschicht (Abb. 4D) abgrenzt. Durch die Oberflächenstruktur des Tentakepithels (Abb. 4F) wird die Anordnung der einzelnen pallisadenähnlichen Epithelzellen deutlich.

Lichtmikroskopie:

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Semidünnschnitte der Tentakel von *Pomatias elegans* (Abbildung 5) zeigen ebenfalls einen geschichteten Aufbau. Hierbei ist die mit Toluidinblau heller gefärbte Tentakepidermis mit ihren dunkleren Zellkernen, schon bei geringer Vergrößerung (Abb. 5 A und B) deutlich vom darunter liegenden kompakteren Mesenchym abgrenzbar. Das Mesenchym und die Epithelzellschicht sind durch eine dunklere Schicht, die Basalmembran, voneinander getrennt (Abb. 5C und D). Das Mesenchym ist unterschiedlich stark angefärbt und organisiert (Abb. 5A - C). Apikal von den Tentakepithelzellen befindet sich ein weiterer schma-

ler, hellerer ca. 1,5 μm breiter Bereich, der Mikrovillisaum (Abb. 5D).

Die pallisadenähnlichen Tentakepithelzellen sind eher länglich (10 - 60 μm) als breit und jede Zelle hat Kontakt zur darunterliegenden Basalmembran (Abb. 5D). Die Zellkerne der Epithelzellen liegen basal und sind meist langgestreckt (Abb. 5C und D). Innerhalb der Tentakepidermis sind fassförmige Becherzellen, durch ihre etwas andere Anfärbung gut zu erkennen. Sie besitzen zusätzlich im Inneren dunkler angefärbte und zum Teil rötliche und kugelige Granula, welche die gesamte Zelle ausfüllen (Abb. 5D).

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM):

Die Tentakepithelzellen verfügen im apikalen Bereich über einen homogenen dicht stehenden Mikrovillisaum (Abb. 6 - 8). Die Mikrovilli zeigen sich hierbei langgestreckt mit einer Länge von ca. 1,2 bis 2,1 μm . An der apikalen Seite der Mikrovilli des Tentakepithels befindet sich ein etwas dunklerer, feiner Aufsatz, der die Glykokalyxschicht

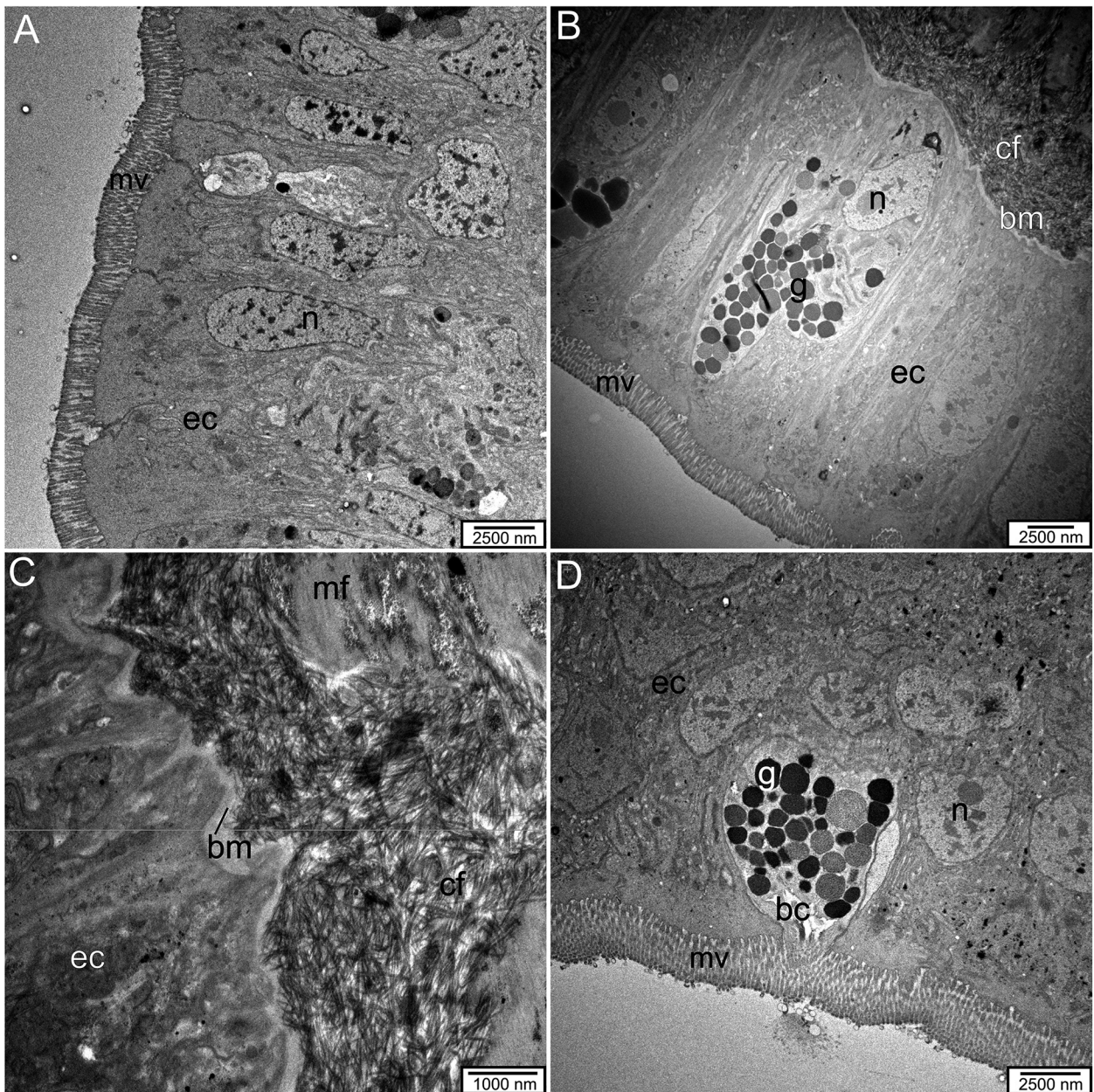


Abb.6. Längsschnitt durch das Epithel der Tentakel von *P. elegans*. TEM. **A, B** und **D** geben eine Übersicht über die verschiedenen Abschnitte des einschichtigen Epithels. **B** präsentiert das Epithel (**ec**) im Ganzen von den Mikrovilli (**mv**) bis zur Basalmembran (**bm**). **C** zeigt den basalen Bereich von den Epithelzellen über die Basalmembran bis zur extrazellulären Matrix mit Kollagenfibrillen (**cf**) und Muskelfasern (**mf**). **D** bildet eine Becherzelle (**bc**) detailliert ab. **n** Nucleus, **g** Granula, **cf** Kollagenfibrillen, **mf** Muskelfaserbündel.

repräsentiert (Pfeil in Abbildung 8C).

Benachbarte Tentakepithelzellen sind lateral eng miteinander verzahnt. Sie sind hierbei einerseits durch komplexe Membraneinfaltungen (Abb. 7B, D), andererseits durch „septate junctions“ miteinander verbunden (Abb. 8C).

Das einschichtige Tentakepithel weist zwei unterschiedliche Zelltypen auf (Abb. 6B), zum einen ca. 25 - 30 μm lange und ca. 5 - 6 μm breite Epithelzellen mit Mikrovillisaum, feiner innerer Struktur und prominenten Kern (Abb. 6A und 7B) und zum anderen fassförmige Be-

cherzellen mit ähnlicher Länge, aber einem breiteren Durchmesser von ca. 5 bis 12 μm . Diese Becherzellen tragen ebenfalls einen Mikrovillisaum (Abb. 6D, 7A, 7C), jedoch sind die Feinstrukturen und der Zellkern aufgrund der Granula nicht immer eindeutig zu sehen (Abb. 6B). Eine Öffnung der Becherzelle ist an der apikalen Seite zu erkennen (Abb. 6D, 7A, 7C), die von einem mehrreihigen, kompakter stehenden Mikrovillisaum umgeben ist (Abb. 7C). Der freigesetzte Inhalt eines Granulum ist außerhalb des Mikrovillisaums zu erkennen (Abb. 7A, C). Die Granula der Becherzellen

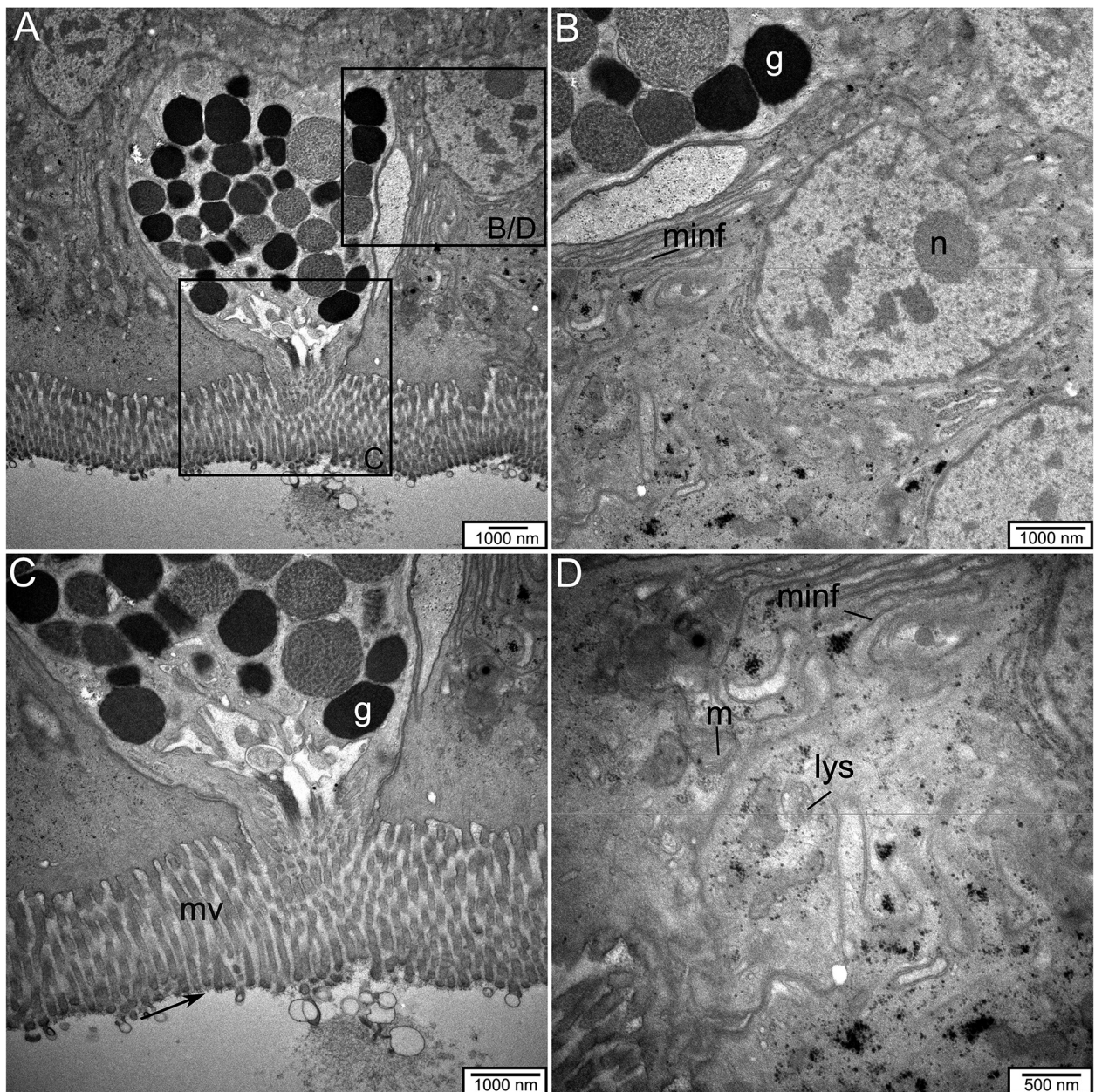


Abb.7. Längsschnitt durch eine Becherzelle des Epithels von *P. elegans*. TEM. **A** zeigt eine Übersicht einer Becherzelle mit hervorgehobenen rechteckigen Ausschnitten (für B, C und D). **B** bildet einen Zellausschnitt mit sichtbaren Membraneinfaltungen (**minf**) zwischen zwei Epithelzellen ab. In **C** ist der apikale Bereich der Becherzelle zu sehen (Pfeil Glykokalyx, **mv** Mikrovilli). **D** gibt eine Detailansicht der Membraneinfaltung (**minf**) und Zellorganellen, wie Mitochondrien (**m**) und Lysosomen (**lys**), wieder. **n** Nucleus, **g** Granula.

besitzen einen Durchmesser von ca. 0,3 bis 1,5 μm und variieren in ihrer Farbe von grau bis schwarz (Abb. 6B, 6D und 7A-C).

Im basalen Bereich weisen die Epithelzellen eine ca. 0,28 μm schmale, hellere Basalmembran auf, die mit der darunterliegenden extrazellulären Matrix undulierend und zum Teil verzahnt verbunden ist (Abb. 6B und C). Unterhalb der extrazellulären Matrix befindet sich eine ca. 3 - 4 μm breite, feinfaserige Schicht aus Kollagenfibrillen mit dazwischenliegenden Muskelfasern (Abb. 6C). Diese Schicht geht fließend in einen durch Muskulatur dominierten Bereich über (Abb. 6B).

Der Zellkern (Nucleus) liegt meist basal in den Tentakelepipithelzellen (Abb. 6A, B). Die Zellkerne (Abb. 6, 7 und 8) weisen eine runde bis längliche Form, in variabler Größe mit hellen und dunklen Bereichen, dem Euchromatin und Heterochromatin, und einem dazu gehörenden Kernkörperchen (Nucleolus; Abb. 7B) mit einem Durchmesser von ca. 0,1 μm auf. Mitochondrien kommen eher im mittleren bis apikalen Bereich der Epithelzellen vor und sind vor allem durch ihre Cristae von anderen Organellen zu unterscheiden (Abb. 7D und 8D). Mehrheitlich erscheinen sie eher rundlich und ihre Größe schwankt von ca. 0,5 - 1 μm

(Abb. 8D). Des Weiteren sind im Zytoplasma Lysosomen von ca. 0,5 μm Größe (Abb. 8C) und schwarze, wenige Nanometer große Pigmentgranula vorhanden (Abb. 8D). Diese liegt zum Teil angesammelt in den Epithelzellen

vor (Abb. 8C). Andere Organellen sind in den Tentakelepithelzellen vorhanden, können aber nicht eindeutig identifiziert werden.

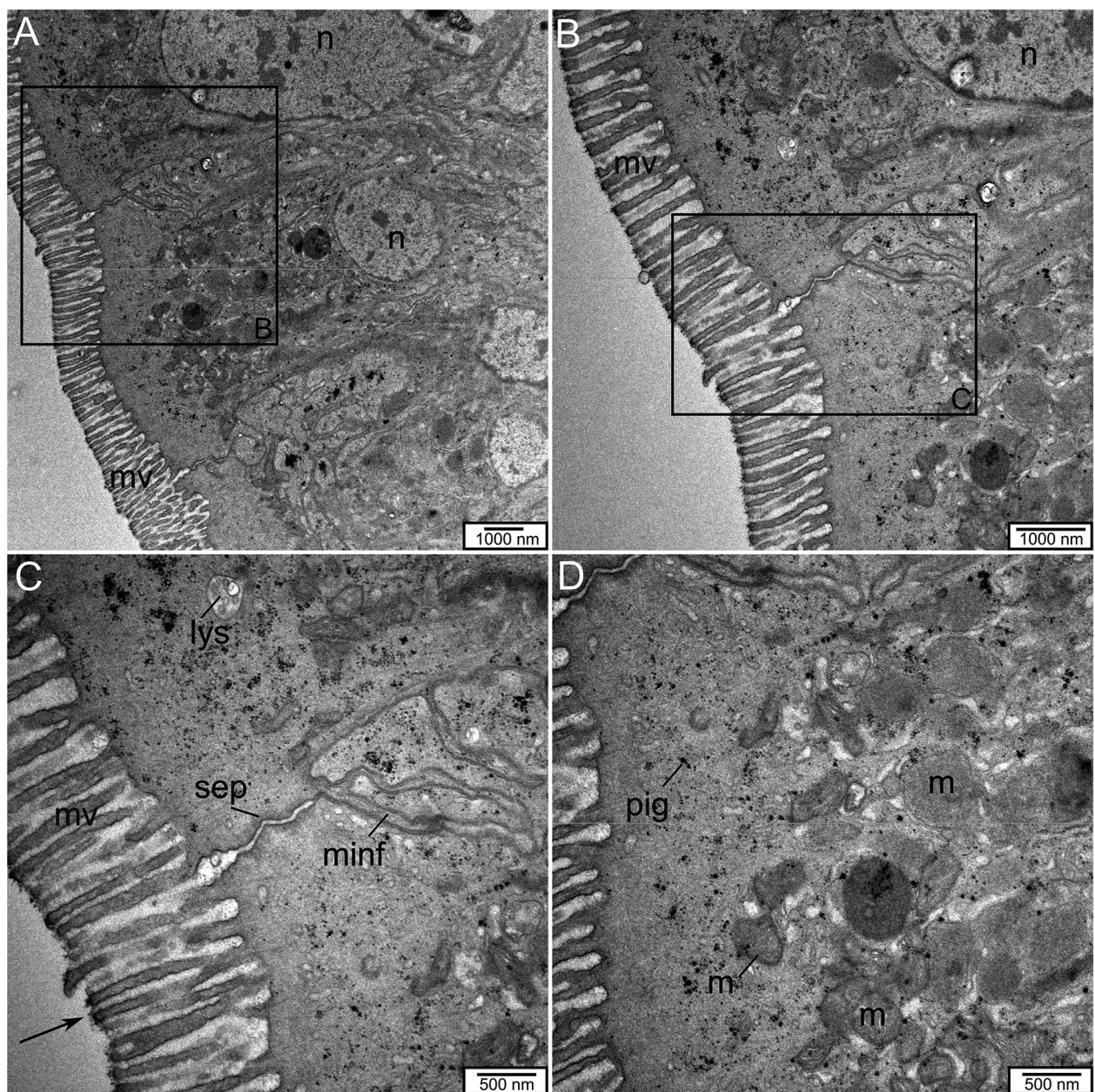


Abb.8. Längsschnitt durch Epithelzellen von *P. elegans*. TEM. **A** zeigt eine Epithelzelle mit deutlich erkennbaren Zellabgrenzungen im oberen lateralen Bereich der Zelle (hervorgehobene Rechtecke in **B**, **C** und **D** vergrößert). **C** stellt deutlich die Zellverbindung „septate Junctions“ (**sep**) dar und im Zellausschnitt **D** sind Pigmentgranula (**pig**) und Mitochondrien (**m**) erkennbar. **n** Nucleus, **mv** Mikrovilli, **lys** Lysosomen, **minf** Membraneinfaltungen, Pfeil Glykokalyx.

Diskussion

Die Schöne Landdeckelschnecke *Pomatias elegans* ist mit ihrer einzigartigen Fortbewegung besonders unter den in Deutschland vorkommenden Schneckenarten. Der Aufbau des Epithels, zeigt den typischen Aufbau der Unterklasse Prosobranchia (Harrison, et al., 1994), wie man in allen drei optischen Verfahren (Lichtmikroskopie, REM, TEM) erkennen kann. Das Epithel weist eine typische Grundstruktur auf, die aus einer einzelnen Zellschicht mit darunterliegender Basalmembran (Harrison, et al., 1994; Pinchuk & Hodgson, 2010) besteht. Die Epithelzellen sind säulenförmig und sie tragen alle Mikrovilli (Harrison, et al., 1994; Schwalbach & Lickfeld, 1962; Wondrak, 1981). Ein Unterschied in der Struktur des Epithels unserer Tentakelspitze zeigt sich jedoch darin, dass entgegen vorangegangenen Beschreibungen der Prosobranchia (Harrison, et al., 1994), keine Zilien am Epithel zu sehen sind. Die Präsenz von Zilien spielt besonders für die sensorische Wahrnehmung eine Rolle (Emery, 1992; Greistorfer, et al., 2017) und sie kommen an der Spitze der Tentakel in sensorischen Zellen an der apikalen Seite vor (Wondrak, 1981).

Auch bei terrestrischen Pulmonaten wurde bereits im Bereiche der Tentakel gezeigt, dass das Epithel eine kompakte Mikrovilli-Grenze ohne Zilien aufweist (Emery, 1992). Daher könnte man darauf schließen, dass an dieser Stelle am Tier (proximaler Teil der Tentakel) keine Zilien vorhanden sind.

Die Abwesenheit der Zilien bei terrestrischen Pulmonaten und Prosobranchia könnte einen Hinweis darauf geben, dass Zilien in der Epidermis der Gastropoda unabhängig voneinander evolviert sind. Besonders in Verbindung mit der Terrestrialisierung, die ebenso mehrmals unabhängig voneinander innerhalb der Gastropoden erreicht wurde (Barker, 2001).

Dennoch können die Grundzellarten (Epidermis-, Zilien- und Sekretionszellen) je nach Lage und Funktion, als auch nach Spezies, variieren (Barker, 2001; Wondrak, 2012; Harrison, et al., 1994). Dies wird ebenso durch eine Studie über *Helix pomatia* (Greistorfer, et al.,

2017) bestätigt, da sich bei dieser Art bereits das Epithel des Fußsegments vom ventralen Bereich (Mikrovilli mit Zilien) zum dorsalen Bereich (Mikrovilli ohne Zilien) unterscheidet. Diese Unterschiede des Epithels könnten darauf zurückgeführt werden, dass unterschiedliche Körperregionen verschiedenen funktionellen Ansprüchen gerecht werden müssen, wie z.B. das Fußsegment mehr bei der Bewegung eine Rolle spielt, als die Tentakel, die in der sensorischen Wahrnehmung wichtiger ist. Die mögliche Variation zwischen den Spezies wird ebenfalls im Vergleich der Kursresultate bezüglich der anderen beiden Schneckenarten untermauert, da jeweils das Epithel der Sumpfdeckelschnecke *V. viviparus* (Kursdaten von S. Körner & M. Gäde) als auch der marinen Schnecke *S. divaricata* (Kursdaten von L. al Jalali & P. Segelitz) deutliche Zilien (im Fußsegment) aufweist.

Das vereinzelte Vorkommen von Becherzellen ist ebenfalls beschrieben worden (Harrison, et al., 1994), welche sich mit unseren Ergebnissen von der Tentakel von *P. elegans* deckt. Wie bereits bei anderen Arten (Wondrak, 1984; Harrison, et al., 1994) und auch bei *P. elegans* (Zaitseva, 1997; Wondrak, 1981) beschrieben, konnten hier keine sensorischen Zellen und Rezeptorzellen im Tentakepithel, in den vorliegenden Schnitten und Oberflächenaufnahmen gesehen werden. Da, wie bereits geschildert, die Schnitte nicht von der Tentakelspitze stammen, wo viele solcher Zellen, die auch Zilien tragen, vorkommen (Wondrak, 1981).

Die Epithelzellen waren untereinander durch starke Membraneinfaltungen verbunden. Dies wurde auch schon bei der Landlungenschnecke *Helix pomatia* L. beobachtet (Schwalbach & Lickfeld, 1962). Diese Einfaltungen könnten für eine höhere Robustheit und Flexibilität sorgen, um den Erhalt des Epithels zu garantieren. Ebenso, wie in dieser Studie abgebildet, wurde die basale Lage des Zellkerns in den Epithelzellen für *H. pomatia* beschrieben (Greistorfer, et al., 2017). Der „junctional complex“ befindet sich in apikaler Richtung

zu den Einfaltungen und zeigt sich somit, in dem für *P. elegans* typischen Aufbau, da sich die Zonula septata unmittelbar neben der Zonula adhaerens befindet (Wondrak, 1981). Dies ist zwar typisch für *P. elegans*, aber es ist nicht einzigartig, da dieser Aufbau auch bei anderen Schnecken, wie *H. pomatia*, gezeigt wurde (Wondrak, 1981).

Die extrazelluläre Matrix von *P. elegans* zeigt ebenfalls den für die Unterklasse der Prosobranchia charakteristischen Aufbau (Harrison, et al., 1994). Bei den Kollagenfibrillen konnte man hier sogar vereinzelt die charakteristische hell-dunkel Streifung wahrnehmen (nicht zu sehen in den Abbildungen). Die Muskulatur kommt bei Schnecken (Prosobranchia) in fast allen Weichteilbereichen vor und ist für die Beweglichkeit und Fortbewegung dieser wichtig und deshalb so stark ausgeprägt (Harrison, et al., 1994).

Für die vorliegende Arbeit wurden drei verschiedene optische Methoden verwendet. Die gleichzeitige Anwendung der drei Mikroskopieformen (Lichtmikroskopie, REM und TEM) zeigen deutlich, dass Informationen durchaus einen ergänzenden Charakter haben und einfach miteinander verknüpft werden können. Dadurch werden die Vorteile der Methoden, wie die strukturellen Zusammenhänge durch die Oberflächendarstellung durch das REM und die Abbildung der detaillierten Zellkomposition durch das TEM, aufgrund

des besseren Auflösungsvermögens gegenüber der Lichtmikroskopie, hervorgehoben (Stach & Martin, 2018). Die Schwierigkeiten der Methoden werden besonders in der umfassenden Präparation der Gewebestücke für das TEM deutlich, die sich vor allem in der Befilmung der Grids aber auch im Schneiden der Ultradünnschnitte mittels Glasmesser (schlussendlich mit einem Diamantmesser durchgeführt) zeigen.

Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich das Epithel im proximalen Bereich der Tentakel untersucht wurde, können nur beschränkte Einblicke beziehungsweise Aussagen zum Aufbau der Epidermis gemacht werden. Dies wird sowohl im Vergleich mit vorangegangener Literatur deutlich, als auch in Betrachtung der Resultate bezüglich verschiedener Schneckenarten innerhalb des Kurses.

Um einen umfassenderen Eindruck der Ultrastruktur von der Epidermis von *P. elegans* zu bekommen müssten weitere Tiere untersucht werden, speziell die Anfertigung von Serienschnitten von unterschiedlichen Bereichen des Epithels wären notwendig. Weitere Arten aus den drei Ökosystemen (Land, Süß- und Salzwasser) sollten ebenso für weitere Vergleiche herangezogen werden.

Literatur

- Barker, G. M., 2001. The biology of terrestrial molluscs. Hamilton: CABI.
- Cole, T. C. H., 2017. Wörterbuch der Wirbellosen / Dictionary of Invertebrates Latein-Deutsch-Englisch. 1. Auflage ed. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Emery, D. G., 1992. Fine structure of olfactory epithelia of gastropod molluscs. Microscopy research and technique, 22(4), pp. 307-324.
- Greistorfer, S. et al., 2017. Snail mucus – glandular origin and composition in *Helix pomatia*. Zoology (Jena, Germany), Volume 122, pp. 126-138.
- Harrison, W. F. et al., 1994. Microscopic Anatomy of Invertebrates, Mollusca 1. New York: Wiley-Liss.
- Mizzaro-Wimmer, M., Salvini-Plawen, L., Kothbauer, H. & Starmühlner, F., 2001. Praktische Malakologie: Beiträge zur vergleichend-anatomischen Bearbeitung der Mollusken: Caudofoveata bis Gastropoda - „Streptoneura“. 1. Auflage ed. Wien; New York: Springer-Verlag.
- Pinchuk, S. C. & Hodgson, A. N., 2010. The ultrastructure and histology of the perinotal epidermis and defensive glands of two species of *Onchidella* (Gastropoda: Pulmonata). Tissue & cell, 42(2), pp. 105-115.
- Richling, I. & Groh, K., 2017. Die Deutsche Malakozoologische Gesellschaft. [Online] Available at: http://www.dmg.mollusca.de/images/download/weichtier-des-jahres/weichtier_2017_schoenelanddeckelschnecke_web.pdf [Accessed 1. Mai 2018].
- Schwalbach, G. & Lickfeld, K. G., 1962. Die Epidermis-Morphologie der Sinneskalotte von *Helix pomatia* L.. Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie, 58(2), pp. 277-288.
- Stach, T. & Martin, P., 2018. Elektronenmikroskopische Methoden in der Biologie - Skript zum Modul MB-A54. Berlin: Humboldt-Universität zu Berlin.
- wikipedia-Schnecken, 2018. Wikipedia - Die freie Enzyklopädie. [Online] Available at: <https://de.wikipedia.org/wiki/Schnecken> [Accessed 1. Mai 2018].
- Wondrak, G., 1981. Ultrastructure of the Supporting Cells in the Chemoreceptor Areas of the Tentacles of *Pomatias elegans* (Müller) (Mollusca, Prosobranchia) and the Ommatophore of *Helix pomatia* L. (Mollusca, Pulmonata). Journal of Morphology, 167(2), pp. 211-230.
- Wondrak, G., 1984. Ultrastructure of the Sensory Epithelia of Oral Tube, Fungiform Sensory Bodies, and Terminal Knobs of Tentacles of *Ovatella myosotis* Draparnaud (Archaeopulmonata, Gastropoda). Journal of Morphology, 181(3), pp. 333-347.
- Wondrak, G., 2012. Monotypic gland-cell regions on the body surface of two species of *Arion*: ultrastructure and lectin-binding properties. Journal of Molluscan Studies, 78(4), pp. 364-376.
- Zaitseva, O., 1997. Structural organization of receptor elements and organs of the land mollusk *Pomatia elegans* (Prosobranchia). Neuroscience and behavioral physiology, 27(5), pp. 533-540.

Ultrastruktur des Epithels von *Viviparus viviparus*.

Gäde, Mario; m.gaede@gmx.net

Körner, Sandra; sandra_koerner@gmx.net

Abstract

In diesem Praktikum wurden drei verschiedene Deckelschnecken - eine marine, eine Süßwasser- und eine Landdeckelschnecke - untersucht, wobei sich diese Arbeit mit der stumpfen Sumpfdeckelschnecke *Viviparus viviparus* befasst. Die elektronenmikroskopisch erstellten Bilder unseres selbst angefertigten Präparates waren sehr gut geeignet, um die aus der Literatur beschriebenen epidermalen, sekretorischen und bewimperten Zellen der Epidermis zu identifizieren und zuzuordnen. Die vorgefundene Epidermis besteht aus einer Schicht sehr schmaler Zellen, die größtenteils eine Mukus-produzierende Funktion hatten und sehr stark mit Cilien und teilweise mit Mikrovilli bedeckt waren. Daraus wurde geschlussfolgert, dass es sich bei den betrachteten Epithelabschnitten der Präparate vermutlich um einen Abschnitt des Fußes handelt, welcher eine hohe Schleimproduktion und viel Bewegung liefert.

Einleitung

Die Familie der Sumpfdeckelschnecken (Viviparidae) kommt bis auf wenige Orte weltweit vor und ist in den europäischen Breitengraden mit fünf Arten vertreten. Sie kommen im Süßwasser vor und besitzen ein kalkhaltiges und festes Gehäuse, welches sie mit einem fest am Fuß verwachsenen Deckel verschließen können. So sind sie in der Lage sich bei Gefahr zurückzuziehen und sich vor Austrocknung zu schützen. Bei der Winterruhe ist dieser Deckel ebenso wichtig, da die Schnecke sich am Grund des Gewässers vergräbt und sich mit dem Deckel verschließt (Fechter, 1990). Den wissenschaftlichen Namen *Viviparus* verdanken die Schnecken ihrer Fähigkeit der Lebendgeburt, womit sie im europäischen Raum die einzigen Vertreter der lebendgebärenden (ovoviviparen) Schnecken sind. Die Jungtiere schlüpfen noch in der Mantelhöhle der Mutter und verlassen als vollständig ausgebildete Schnecken mit einer Größe von ca. 10 mm die Mutter (Fechter, 1990). Bei *V. viviparus* handelt es sich um getrenntgeschlechtliche Lebewesen. Hierdurch lassen sich die Männchen und Weibchen aufgrund der Beschaffenheit der Fühler unterscheiden. So ist der rechte Fühler der Männchen zum Begattungsorgan umgebildet, wodurch dieser dicker als der linke Fühler erscheint. Bei Weibchen hingegen sind die beiden Fühler identisch ausgebildet. Während Jungtiere noch ein deutliches Streifenmuster aufweisen,

verblasst dieses bei älteren Tieren zunehmend (Fechter, 1990). Sumpfdeckelschnecken sind Weidegänger und ernähren sich hauptsächlich von Detritus und Algen, welche sie mit ihrer Radula abraspeln. Zusätzlich sind sie in der Lage winzige Nahrungspartikel und Plankton mit Hilfe eines Netzes aus selbst gebildetem Schleim aus dem Wasser zu filtrieren. Dieses Schleimnetz wird an der Kiemenbasis vom Endostyl gebildet und filtert so Partikel aus dem Wasser, welches anschließend bei der Atmung die Kiemen durchspült. Danach wird aus dem Schleimfilter und den Nahrungspartikeln eine Schleimwurst geformt, welche in der Futterrinne zum Kopf hin befördert wird (Buddenbrock, 1956).

Die Körperoberfläche besteht im Allgemeinen aus länglichen Epithelzellen, die mit kurzen Wimpern bedeckt sind, wobei der Fuß der Schnecke durch länger bewimperte Zellen charakterisiert wird (Fretter, 1962). Zudem besitzen die meisten Epithelzellen Mikrovilli an ihrer Oberfläche (Machin, 1977). Die drei häufigsten Zelltypen der Epidermis bei Prosobranchia sind epidermale, sekretorische und bewimperte Zellen (Abb. 1). Trotz dieser allgemeinen Einteilung kann die Funktion des Epithels sehr weit gefächert sein. So kann es neben dem Schutz vor der Umwelt eine respiratorische Funktion besitzen oder auch der Assimilation von Nährstoffen, der Entgiftung, der Bewegung, der Wahrnehmung

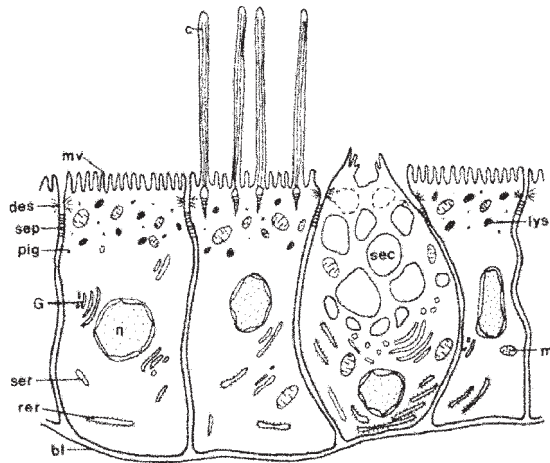


Abb.1. Darstellung verschiedener Zelltypen im Epithel von Gastropoden. Zu sehen sind epidermale (links), bewimperte (mittig) und sekretorische (rechts) Zellen. Nicht maßstabsgetreu. Mikrovilli (mv), Desmosom (des), Septumverbindung (sep), Pigment (pig), Golgi-Apparat (G), glattes Endoplasmatisches Retikulum (ser), raues ER (rer), Basallamina (bl), Cilium (c), sekretorische Vakuole (sec), Lysosom (lys), Mitochondrium (m). Entnommen aus Harrison (1994).

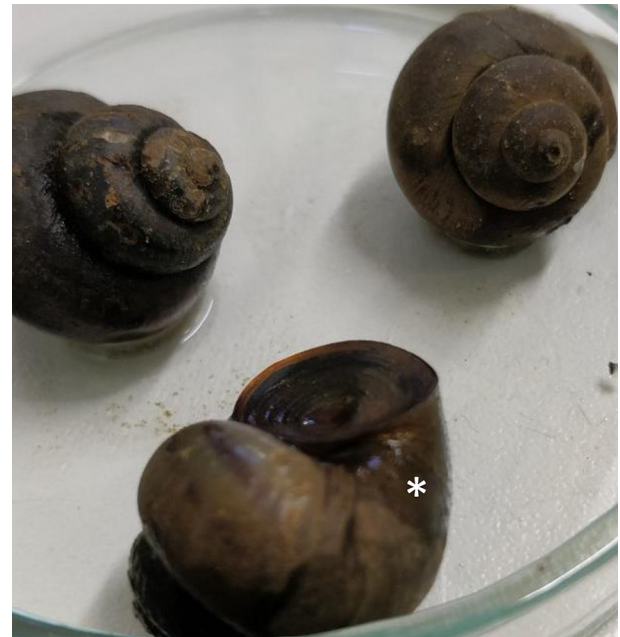


Abb.2. Zu sehen sind die gesammelten Exemplare vor der Probenentnahme. Diese hatten eine Gehäusegröße von ca. 4-5 cm in der Höhe. Auf der Unterseite des vordersten Exemplars ist ein schwaches Streifenmuster erkennbar. Das verwendete Exemplar ist mit einem * gekennzeichnet.

oder der Reproduktion dienen (Graham, 1957; Bubel, 1984).

Diese Arbeit beschreibt das Erstellen und die Analyse von raster- und transmissionselektronenmikroskopischen Bildern. Mithilfe dieser Bilder sollte die Epidermis der stumpfen Sumpf-

deckelschnecke *Viviparus viviparus* untersucht werden, sodass diese mit der Epidermis von zwei weiteren nahen Verwandten, welche in anderen Habitaten vorkommen, verglichen werden können. So sollte überprüft werden, ob es epidermale Anpassungen an das jeweilige Habitat gibt.

Material & Methoden

Die verwendeten Proben wurden einem adulten Exemplar der *V. viviparus* entnommen, welches im April 2018 in Berlin gesammelt wurde. Um an die Epidermis zu gelangen wurde die Schnecke am Deckel herausgezogen und der Deckel samt einem Teil des Fußes abgeschnitten. Von diesem Teil wurden verschieden große Stücke der Ober- und der Unterseite entfernt und präpariert. Die erhaltenen Proben wurden zunächst in einem 0,1 M Phosphatpuffer (pH=7) mit 2,5 % Glutaraldehyd und 2 % Paraformaldehyd für 45 Min. bei Raumtemperatur primärfixiert. Nach einem 5-minütigen Waschschriff in 0,1 M Phosphatpuffer mit einem pH von 6,8 wurde mit einer 1 %igen Osmiumtetroxid-Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer (pH=6,8) für 30 Min. auf Eis sekundärfixiert. Zur Entwässerung wurden die Proben mit einer Reihe aus Waschschriffen à 10 Min in verschiedenprozentigen Ethanol-Lösungen (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100%) auf Eis behandelt. Die Präparate wurden über Nacht in 100 %igem Ethanol bei 4 °C aufbe-

wahrt und am Folgetag erneut mit 100 % Ethanol 10 Minuten gewaschen.

Die Proben wurden nun in REM- und TEM-Proben aufgeteilt. Hierzu wurde eine größere Probe mit einem Skalpell zweigeteilt um einen Querschnitt zu erzeugen. Den Proben für das Rasterelektronenmikroskop (LEO 1430, Zeiss) wurde daraufhin mittels Kritisch-Punkt-Trocknung (CPD 030, Bal-tec) in 13 Wiederholungen die Flüssigkeit vollständig entzogen. Anschließend wurden die REM-Proben auf Objektträger („stubs“) aufgeklebt und nachfolgend mit Goldpartikeln besputtert (Bal-tec).

Die Proben für das Transmissionselektronenmikroskop (EM900, Zeiss) wurden durch das Waschen in Lösungen aus Propylenoxid und Araldit A in verschiedenen Anteilen (1:0, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 0:1) je 2-2,5 h bei Raumtemperatur und letztendlich in Araldit B durch Polymerisation bei 60 °C für 48 h eingebettet. Araldit A bestand hierbei aus 51 % Araldit CY 212 und 49 % DDSA. Araldit B entsprach zu

97,34 % dem Gemisch, welches Araldit A bildet und zusätzlich 2,66 % BDMA als Polymerisationsstarter enthielt. Nach vollständiger Aushärtung wurden Semidünnschnitte mit einer Schnittdicke von 500 nm

mit einem Glasmesser, sowie Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 60 nm mit einem Diamantmesser angefertigt (Reichert Ultracut S).

Ergebnisse

Die gesammelten Exemplare der *V. viviparus* (Abb. 2) zeigten von sich aus keine Bewegungen. Das Gehäuse hatte eine Größe von ca. 4-5 cm in der Höhe und hatte eine dunkelbraune Farbe. Am Rand mancher Exemplare war ein schwaches noch dunkleres Streifenmuster zu erkennen. Die Schnecke selbst war sehr dunkelbraun auf der Oberseite und Dunkelgrau auf der Unterseite. Die Oberseite war nur etwas schleimig, wobei die Unterseite etwas stärker verschleimt war. bei der Probenentnahme konnte nur zwischen Ober- und Unterseite unterschieden werden, da die Sacke vollständig kontrahiert war und somit keine weiteren Strukturen erkennbar waren.

Die Epidermis erscheint in rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen mit einer glatten Oberfläche, die deutliche Falten aufweist (Abb. 3). Die Falten verlaufen ungefähr parallel zueinander um das jeweilige Gewebestück herum und sind etwa 200 μm breit (Abb. 2A, B, D, G). Die Falten können allerdings auch stärker unregelmäßig, runzelig sein (Abb. 2E & F). An den Schnittflächen, wo innere Gewebestrukturen sichtbar werden, wirkt die Oberfläche unregelmäßiger und weist Rissartefakte auf (Abb. 3). Auf der Epidermisoberfläche liegen vereinzelt faserige, verzweigte Strukturen von etwa 0,1 μm Stärke und bis zu 75 μm Länge auf (Abb. 3 A, B; Abb. 4 A, B). Höhere Vergrößerungen der Epidermisoberflächen zeigten, dass diese bei den meisten Präparaten vollständig mit Cilien bedeckt sind (Abb. 4). Häufig ist zu erkennen, dass diese apikal kugelförmig aufgeblasen sind (Abb. 3 4, D). Diese kugelförmigen Enden hatten einen Durchmesser von ca. 0,25 μm . Auf einem der Präparate (Abb. 3 F; Abb. 5) waren keine deutlichen Cilien zu erkennen, stattdessen zeigten sich recht gleichmäßig angeordnete Erhebungen auf der Oberfläche, welche teilweise etwas aufgesetzt erschienen. Diese Erhebungen sind 8 μm im Durchmesser und haben einen regelmäßigen Abstand von 20 μm zueinander (Abb. 5). Auch in den erzeugten Querschnitten sind die Cilien an der Oberfläche sehr gut erkennbar (Abb. 6). Die Epidermis wird von dem darunterliegenden Gewebe durch die Basallamina getrennt (Abb. 6 A, Pfeil), wodurch sich hier ein Bereich von 2-4 μm Stärke zwischen den zwei optisch verschiedenen Geweben ergibt. Die obere Schicht bildet das Epithel mit einer gleichmäßigen Struktur aus langgestreckten Epithelzellen. Unter der Basallamina finden sich Fasern, vermutlich Muskulatur,

und kugelige Strukturen, die Teil der extrazellulären Matrix sind.

Transmissionselektronenmikroskop

In einer zusammengesetzten Übersichtsabbildung (Abb. 7) ist die gesamte Epithelschicht im Querschnitt zu sehen. Die Cilien und Mikrovilli bedecken die gesamte Oberfläche und sind im Querschnitt in verschiedensten Winkeln angeschnitten. Die Cilien erkennt man hier als etwas dickere Strukturen mit zwei zentralen dunkleren Punkten, die peripher von mehreren Punkten ringförmig umgeben sind. Die Mikrovilli sind sehr kurz und etwas dünner als die Cilien und finden sich an der gesamten Oberfläche. Am oberen linken Bildrand ist eine Pore zu sehen, welche nach außen von vielen Mikrovilli bedeckt ist. Darunter finden sich sehr viele Vesikel, welche unterschiedliche Helligkeitsgrade aufweisen und fast den gesamten Raum der oberen Hälfte des Epithels einnehmen. In der Mitte der Epithelschicht befinden sich die Zellkerne, welche gut differenziertes Hetero- und Euchromatin aufweisen. Die untere Hälfte ist teilweise noch mit wenigen Vesikeln durchsetzt, besteht aber größtenteils aus großen Vakuolen, die eine gleichmäßige Helligkeit aufweisen. Die Epithelschicht ist nach unten durch die Basallamina von dem darunterliegenden Gewebe abgetrennt. Das darunterliegende Gewebe besteht überwiegend aus extrazellulärer Matrix, welche sich hier durch unregelmäßige fadenförmige Strukturen auszeichnet. Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Bestandteile sieht man bei der Pore (Abb. 8 A) den nach außen geöffneten Hohlraum, der an der Außenseite von Mikrovilli begrenzt ist. Die Vesikel finden sich direkt unter der Öffnung und zeigen eine eher runde Form mit einer ungleichmäßigen Umrandung. Außerdem sind im inneren unregelmäßige lineare und punktuelle Anordnungen zu sehen, die zunächst mit der Struktur von Mitochondrien verwechselt werden könnten. In Teilabbildung 8 C kann allerdings der visuelle Unterschied zwischen den Vesikeln und tatsächlichen Mitochondrien deutlich dargestellt werden. Die Mitochondrien zeigen eine recht einheitliche mittelmäßige Elektronendichte sowie eine runde Form und eine hellere Grundsubstanz im Inneren, die den Intermembranraum und die Matrix darstellt. Die Vesikel hingegen haben eine sehr ungleichmäßige äußere Umrandung und im Inneren zeigen sich dunklere, ausgewaschene lineare und punktuelle

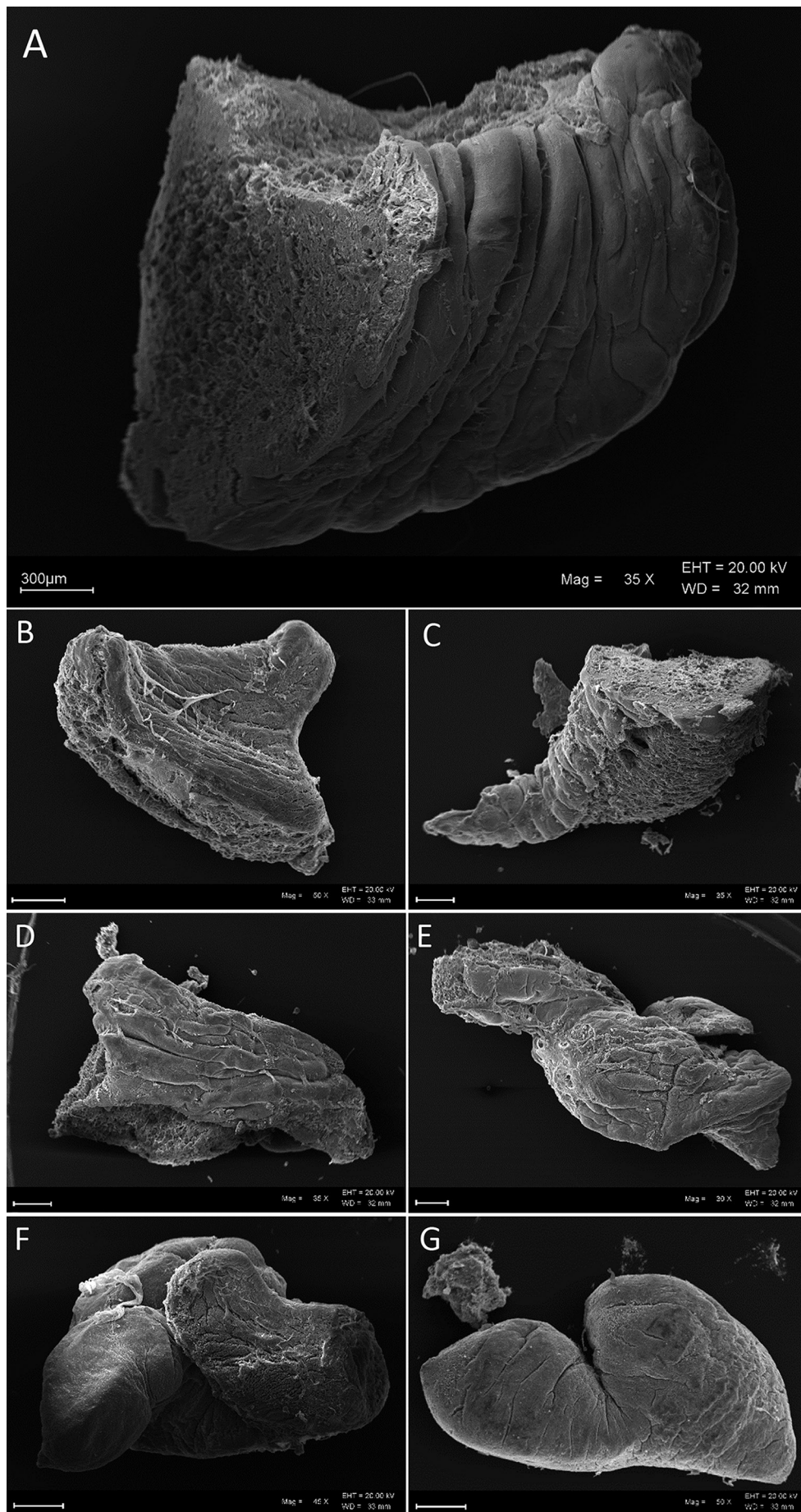


Abb.3. Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsabbildungen der Epithel-Präparate. Zu sehen sind die für die Rasterelektronenmikroskopie angefertigten Präparate, im Folgenden beschrieben als Präparate A, B, C, D, E, F und G. Zu sehen ist, dass die mit Epithel bedeckte Oberfläche ebener wirkt als das löchrige offene Gewebe. Ebenfalls zeigt sich hier die faltige Beschaffenheit der Oberfläche sehr gut. Der Maßstab entspricht 300 μm.

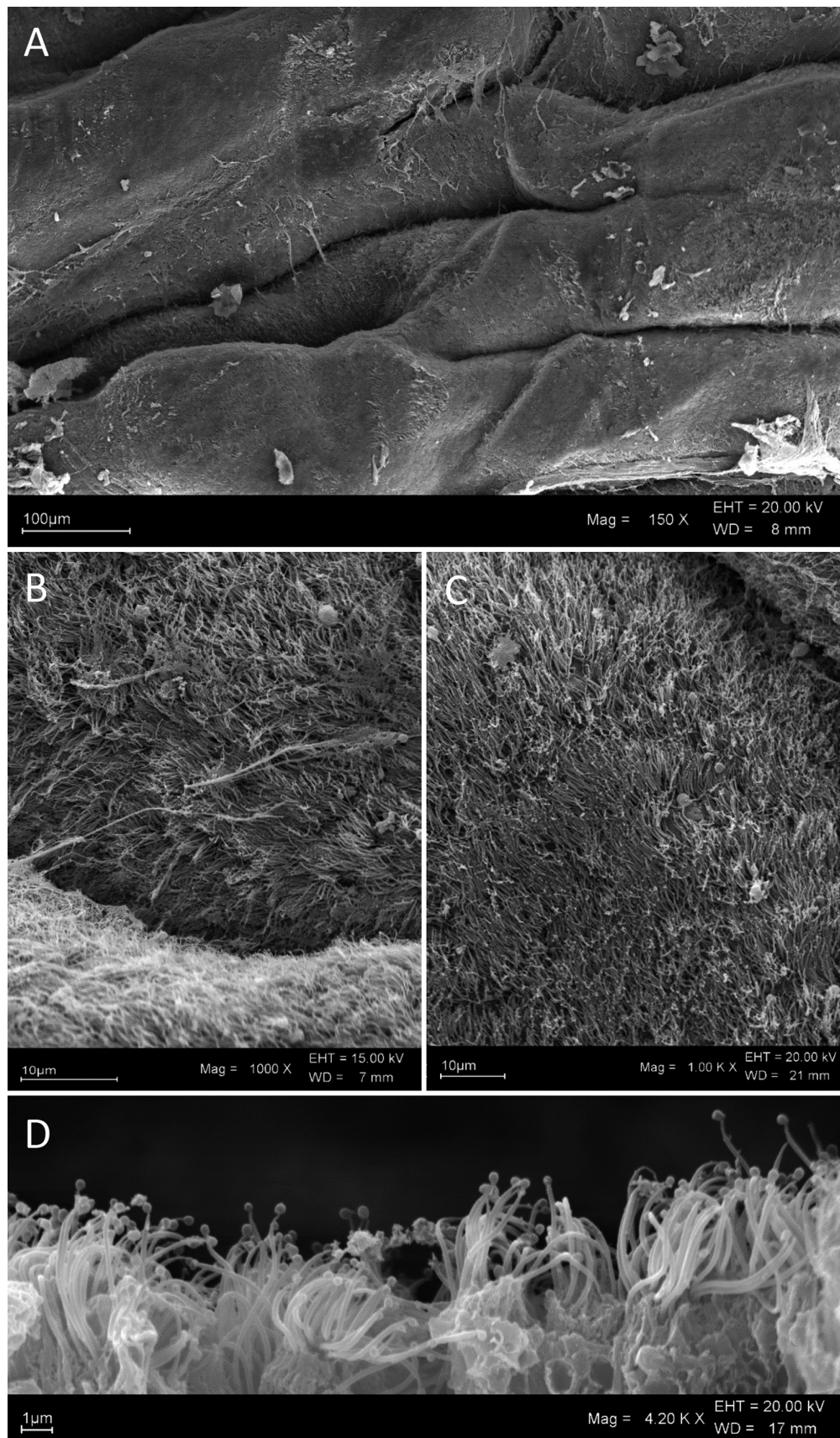


Abb.4. Cilien des Epithels im Rasterelektronenmikroskop. In verschiedenen Vergrößerungen sind die die Oberfläche bedeckenden Cilien mittels Rasterelektronenmikroskop dargestellt. **A:** In einer wenig vergrößerten Ansicht von Präparat D sind die Vertiefungen durch die Falten gut zu sehen, welche oft mit Schleimfäden überspannt sind. Ebenfalls sind die dichten Cilien als leichter Flaum auf der Oberfläche erkennbar. **B:** Eine starke Vergrößerung des Präparates A zeigt eine dicht mit Cilien bedeckte Oberfläche. **C:** Ebenso zeigt die Oberfläche in Präparat E sehr viele Cilien an der Oberfläche, die teilweise einen kugelförmigen Aufsatz am Ende des Ciliums aufweisen. **D:** Sehr hohe Vergrößerungen zeigen die kugelförmigen Aufsätze etwas detaillierter. Die Cilien scheinen spitz zuzulaufen bevor sie mit dem kugelförmigen Aufsatz abgeschlossen werden.

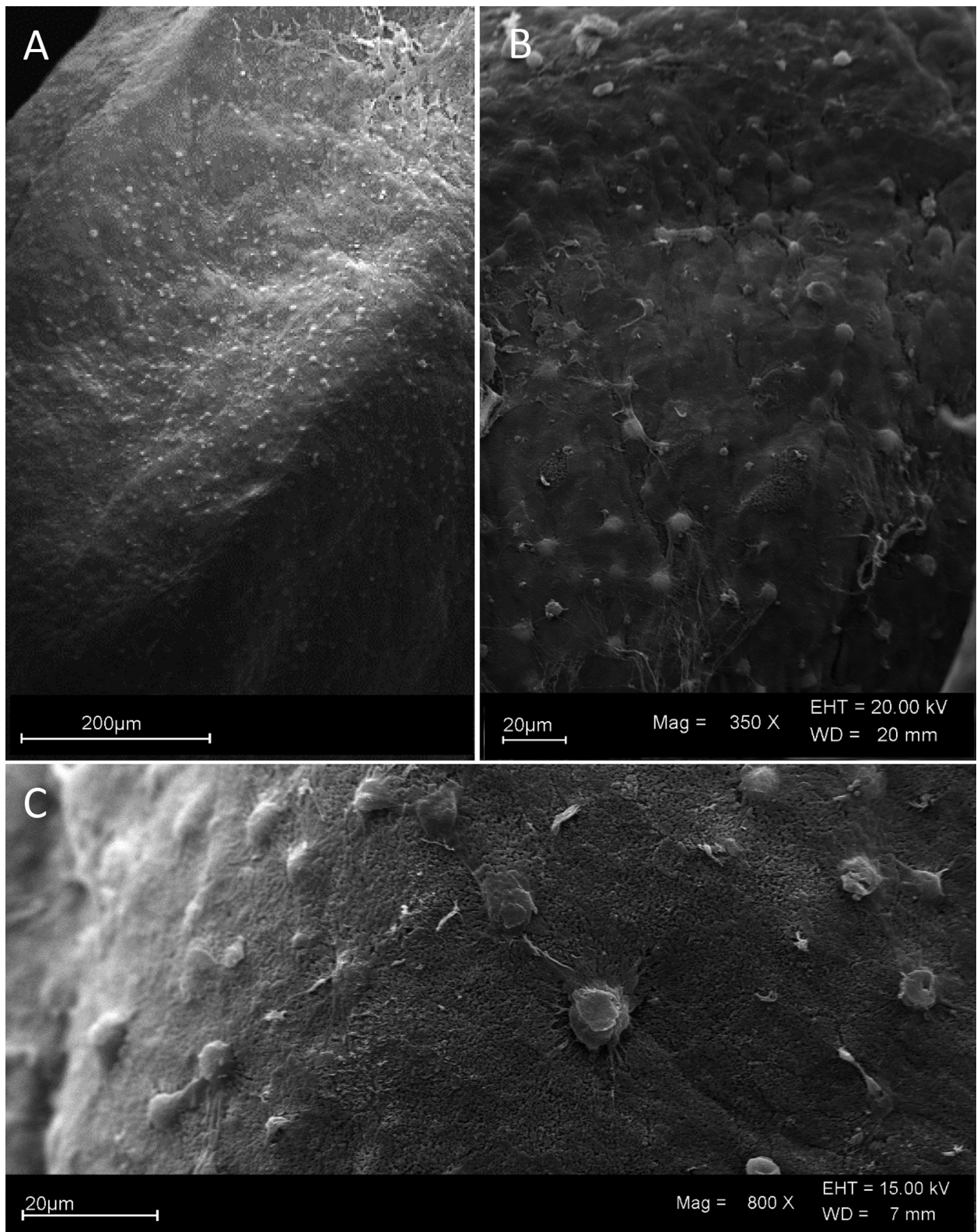


Abb.5. Glatteres Epithel mit eventuellen “Schleimporen” im Rasterelektronenmikroskop. Poren auf der Oberfläche von Präparat F in verschiedenen Vergrößerungen durch das Rasterelektronenmikroskop. **A:** Man kann die gleichmäßige Verteilung der “Poren” auf der Oberfläche erkennen. **B:** Eine höhere Vergrößerung zeigt durch die vielen fadenartigen Strukturen, dass die Oberfläche mit Schleim bedeckt ist. **C:** Weitere Vergrößerungen der “Poren” zeigen, dass es sich hierbei um eine runde Erhöhung handelt, die sich teilweise von der Oberfläche abzuheben scheint und durch fadenartige Strukturen mit dieser verbunden zu sein. Die Oberfläche wirkt uneben und könnte mit Mikrovilli bedeckt sein.

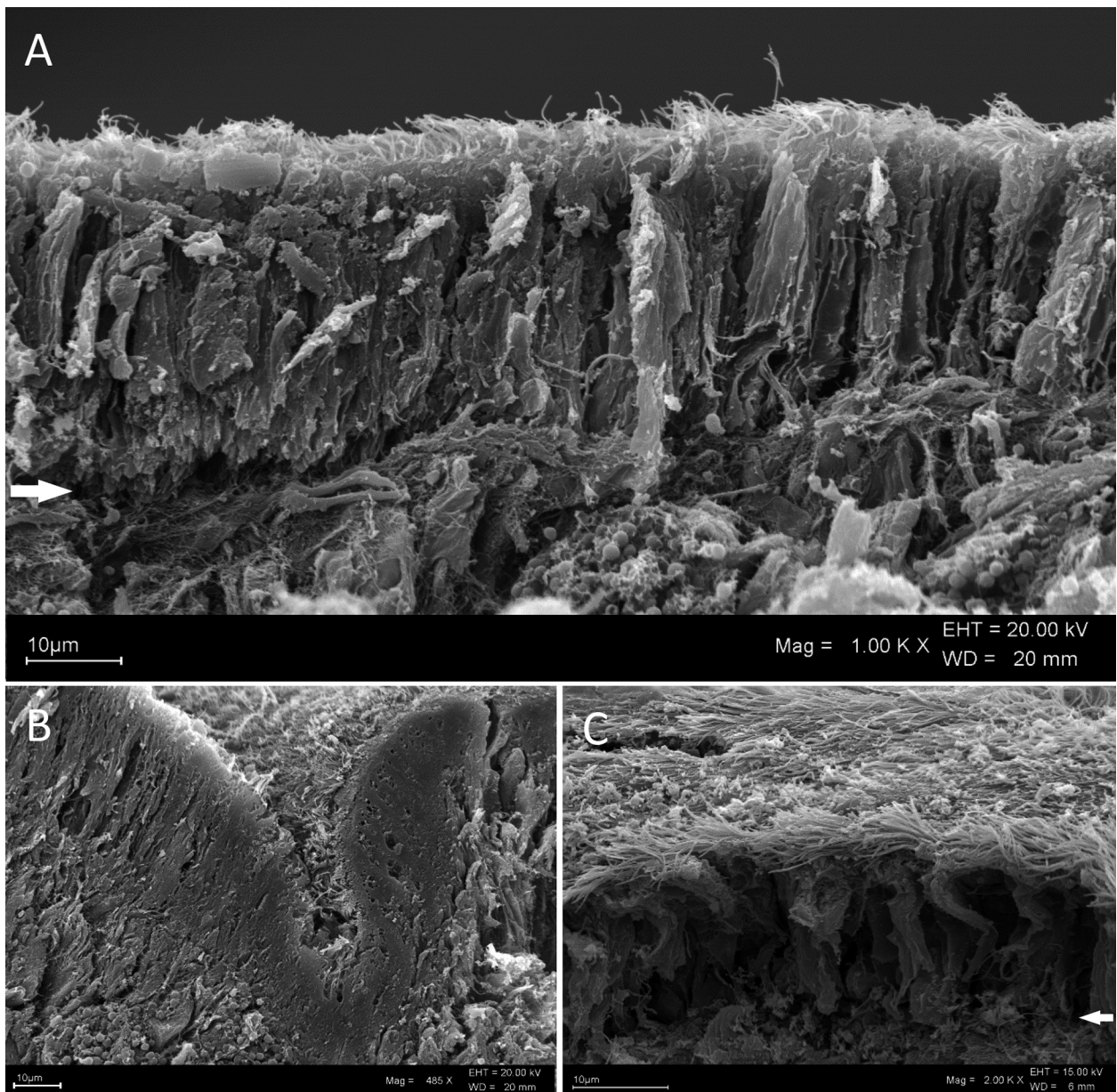


Abb.6. Querschnitte durch das Epithel im Rasterelektronenmikroskop. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen die Oberfläche von *V. viviparus* im Querschnitt von Präparat A. **A:** Abgebildet ist die Epithelschicht, welche nach oben durch Cilien abgeschlossen ist und nach unten durch die Basallamina von dem darunterliegenden Gewebe getrennt ist (Pfeil). Man erkennt ebenfalls, dass die Zellen sehr locker erscheinen, was auf viele mit Flüssigkeit gefüllte Vesikel hinweist. **B:** Querschnitt durch eine der Falten des Epithels. Die Zellen sind hier deutlich dichter gepackt. Trotzdem kann der Übergang vom Epithel zum darunterliegenden Gewebe erahnt werden. Der Maßstab entspricht 20 μ m. **C:** Vergleichbar mit Teilabbildung A ist hier durch eine Draufsicht die mit Cilien bedeckte Oberfläche sichtbar. Die Zellen der Epithelschicht wirken ebenfalls sehr locker und eine Abgrenzung durch die Basallamina ist auch zu erkennen (Pfeil). Hier ist die Zellschicht allerdings dünner als in Abb. A. Der Maßstab entspricht 10 μ m.

Strukturen. Eine Detailaufnahme des Zellkerns (Abb. 8 B) zeigt den zentralen Nucleolus und die Anhäufung des Heterochromatins um diesen sowie an der Zellkernmembran und an einigen Stellen im Zellkern. In dieser Abbildung sind auch die mit Pfeilen markierten Zellmembranen, die die einzelnen Zellen voneinander trennen sehr gut zu erkennen.

Teilweise sind ganze Reihen von Poren nebeneinander zu erkennen (Abb. 9 A). Hier ist das Epithel deutlich dicht mit Cilien mit einer typischen 9x2 +

2-Struktur und 2 μ m langen und 0,1 μ m dicken Mikrovilli bedeckt (Abb. 9 B und C). Die Zellen sind dicht gepackt mit Vesikeln, die an die Poren grenzen und diese umlagern. Bei genauerer Betrachtung der Vesikel fällt an wenigen Stellen auf, dass diese ihre sonst schon ungleichmäßige Struktur verlieren und ineinander übergehen (Abb. 9, E). Zudem sind hier Strukturen in der unteren Hälfte der Epithelzellen zu sehen, welche eventuell Endoplasmatisches Retikulum darstellen könnten.

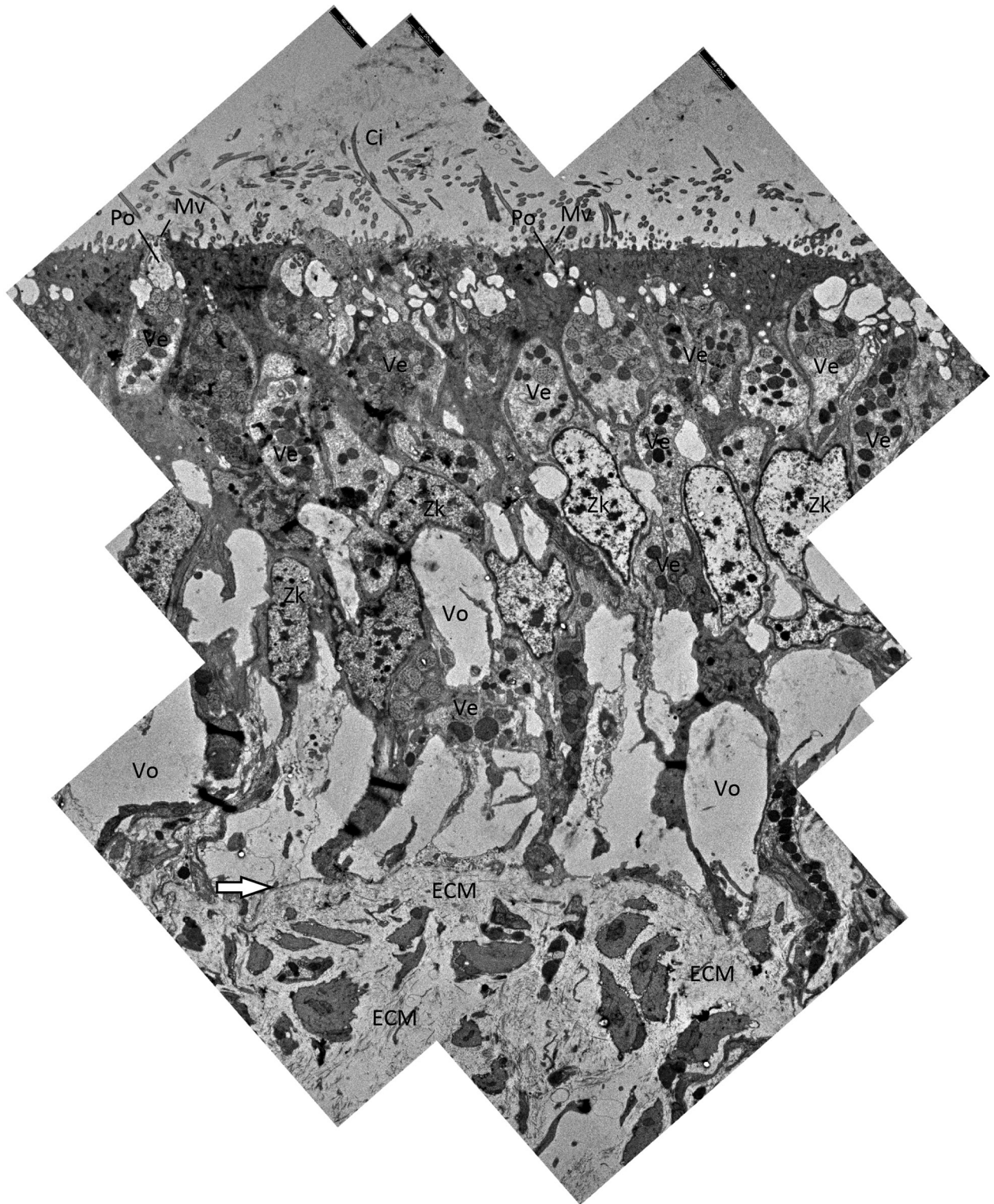


Abb.7. Querschnitte durch das Epithel im Rasterelektronenmikroskop. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen dÜbersichtsabbildung des Querschnittes im Transmissionselektronenmikroskop. Die Abbildung wurde aus mehreren Teilabbildungen zusammengesetzt. Oben sind die in verschiedenen Winkeln angeschnittenen Cilien (Ci) zu sehen. Am linken Bildrand ist direkt an der Oberfläche eine Pore (Po) zu sehen, die an der Außenseite von Mikrovilli (Mv) umrandet ist. Innerhalb der Zellen gibt es viele große Vesikel, die mit kleineren Vesikeln unterschiedlicher Reifegrade (Ve) gefüllt sind, welche sich in unterschiedlicher Helligkeit äußern. Die Zellkerne (Zk) liegen mittig in den Zellen. Am unteren Rand der Zellen befinden sich sehr große "Vakuolen" (Vo). Darunter befindet sich die Basallamina (Pfeil), die die Zellen des Epithels von dem darunterliegenden Gewebe trennt. Darunter befinden sich undefinierbare Zellen und Zellbestandteile eingebettet in extrazellulärer Matrix (ECM). Die Skala (schwarzer Balken, oberer Bildrand) entspricht 2,5 μm .

Diskussion

Bei dem verwendeten Exemplar war aufgrund des nur noch schwach erkennbaren Streifenmusters des Gehäuses davon auszugehen, dass es sich bei dem gewählten Exemplar um ein adultes Tier gehandelt hat. Daher muss im Folgenden keine Rücksicht auf spezielle morphologische Merkmale anderer Entwicklungsstadien genommen werden.

Das markanteste Merkmal der untersuchten Epithelzellen sind wohl die in sehr großen Massen auftretenden Vesikel. Diese zeigten zunächst Mitochondrien-ähnliche Strukturen. Allerdings konnte im weiteren Verlauf aufgezeigt werden, dass es sich hierbei nicht um Mitochondrien handelt, da der Vergleich mit tatsächlichen Mitochondrien starke Unter-

schiede aufzeigte (Abb. 8 C). Diese Vesikel zeigten für Schleimvesikel typische, verschiedene Reifegrade (Abb. 7, 8, 9) und scheinen sich gehäuft unter den Poren an der Oberseite des Epithels zu befinden (Abb. 9 A). Die Lage der Vesikel direkt unter Poren, die große Menge an Vesikeln (Abb. 7) sowie die verschiedenen Reifegrade derer sprechen zunächst für schleimbeinhaltende Vesikel, obwohl diese scheinbar komplexere innere Strukturen aufweisen. In *Aplysia californica* wurden morphologisch ähnliche Vesikel als Mukusvesikel beschrieben (Prince, 2007). Ähnlich sind bei *A. californica* die undefinierten Ränder der inneren Vesikel, die teilweise Desintegration sowie die lineare und punktuelle innere Struktur dieser. Allerdings

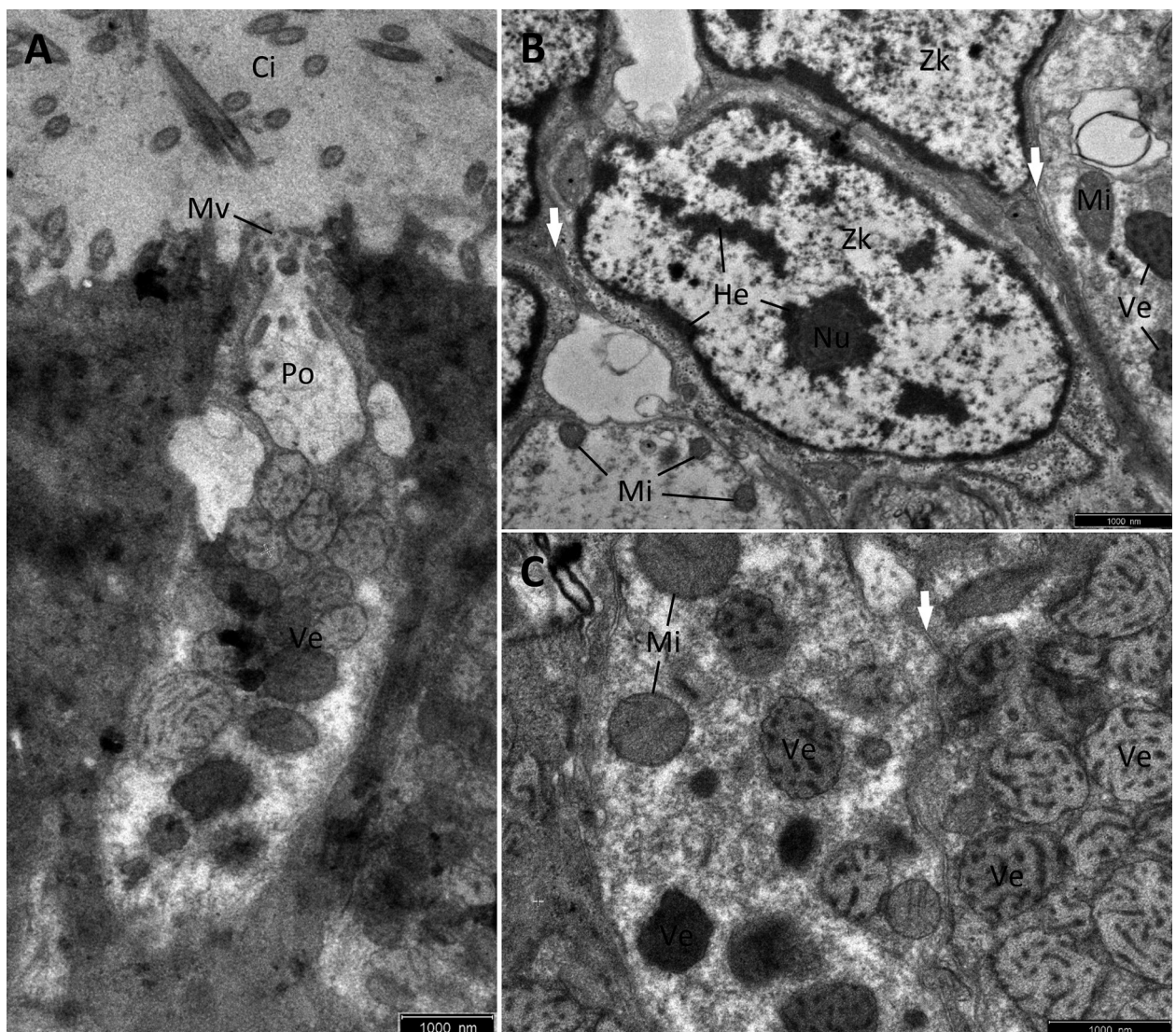


Abb. 8. Transmissionselektronische Detailansichten verschiedener Zellkomponenten. Die gefundenen Zellkomponenten wurden mit 12.000-facher Vergrößerung detailliert dargestellt. Die Maßstäbe aller Abbildungen entsprechen 1 μ m. **A:** Die die Pore (**Po**) umgebenden Mikrovilli (**Mv**) und die darüber liegenden Cilien (**Ci**) bedecken die Öffnung der Pore nach außen. Direkt darunter befinden sich viele Vesikel verschiedener Reifegrade. **B:** Ein Zellkern (**Zk**) mit gut sichtbarem Nucleolus (**Nu**) und den verschiedenen Chromatinstrukturen. Am Zellkernrand, um den Nucleolus sowie an einzelnen Stellen im Zellkern findet sich das dichte Heterochromatin (**He**). In umliegenden Zellen sind Mitochondrien (**Mi**) und Vesikel (**Ve**) zu sehen. Auch die abtrennenden Zellmembranen (Pfeile) sind zu erkennen. **C:** Deutliche Darstellung der visuellen Unterschiede zwischen Mitochondrien (**Mi**) und Vesikeln (**Ve**) in den Epithelzellen. Die Zellmembran ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

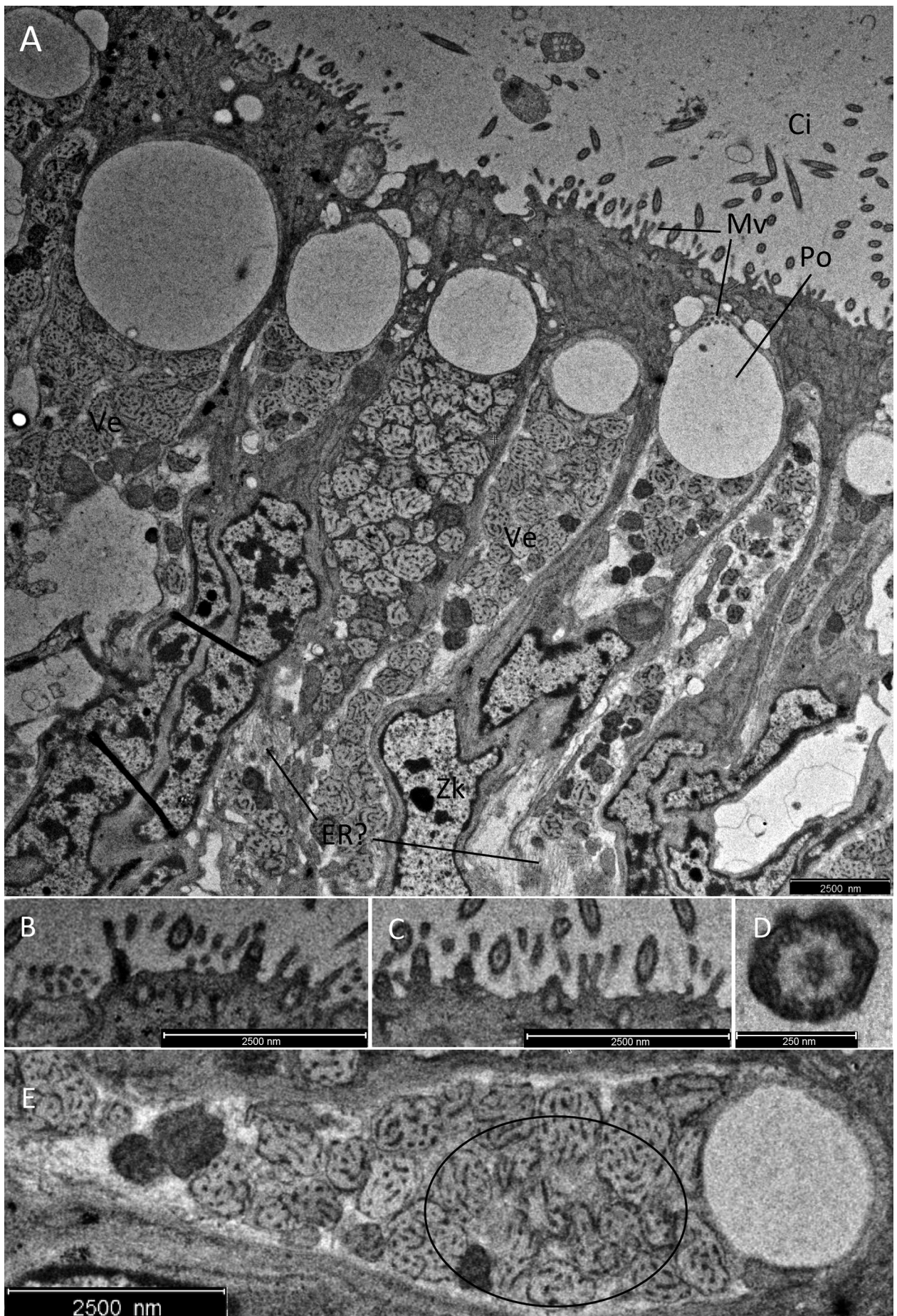


Abb. 9. Eine Reihe von Zellen mit Poren und Mikrovilli-besetzter Oberfläche in rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen. Eine Übersicht und verschiedene Vergrößerungen der gleichen Aufnahme, die die Details zeigen. **A:** Übersicht einer Reihe von Poren (**Po**), unter welchen große Mengen an Vesikeln (**Ve**) zu sehen sind, sowie die mit Cilien (**Ci**) und Mikrovilli (**Mv**) bedeckte Oberfläche. Am unteren Ende der Abbildung ist mögliches Endoplasmatisches Retikulum

fehlen dort die verschiedenen Reifegrade und die innere Strukturierung scheint auch etwas klarer und definierter als in den untersuchten Präparaten aus *V. viviparus*. Die unterschiedlichen Reifegrade der Vesikel und die Desintegration unmittelbar unterhalb der Pore sprechen dafür, dass es sich um Schleimvesikel handelt. Die größeren, hellen, klaren Vakuolen an der zur Basallamina zugewandten Seite (Abb. 7) sind vermutlich mit Flüssigkeit beziehungsweise mit Sekret gefüllt. Aufgrund der scheinbar hohen sekretorischen Funktion der Zellen könnte hier geschlussfolgert werden, dass es sich um ein Sekret handelt, welches nach außen abgegeben werden kann. In Harrison (1994) werden solche gleichmäßig hellen, klaren Vakuolen als Säure-Vesikel bezeichnet. Allerdings gibt es keine bekannten Studien die eine Säureproduktion in *V. viviparus* aufzeigen, weshalb dies eher unwahrscheinlich ist. Die generelle Ultrastruktur von Drüsenzellen in Gastropoden beinhaltet in der Regel ein ausgedehnt raues oder granuliertes endoplasmatisches Retikulum, viele Golgi-Apparate, Mitochondrien und membrangebundene sekretorische Vesikel mit Granula (Harrison, 1994). Allerdings wurden bis auf die in Abb. 9 A gefundenen Strukturen weder große Mengen an endoplasmatischem Retikulum noch Golgi-Apparate gefunden. Durchaus könnte dies an der Präparation liegen, sodass zum Beispiel dünne Membranen schwer sichtbar sind, allerdings waren die Membranen der gefundenen Mitochondrien, sowie einige Zellmembranen auch gut sichtbar.

Die hohe Schleimbildung an der Oberfläche (z.B. Abb. 3 B) und die dicht mit langen Cilien bedeckte Oberfläche spricht durchaus dafür, dass es sich hierbei um den Fuß unseres Präparates handeln könnte. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten auch große Ähnlichkeit mit den Aufnahmen der Füße anderer Spezies wie z. B. *Gomphina veneriformis* (Park, 2012). Auch das Finden der 9x2 + 2-Struktur (Abb. 9 D) spricht dafür, dass es sich hier nicht um primäre, sondern sekundäre Cilien handelt, welche in der Regel motil sind (Lewin, 2007). Die Cilien an der Unterseite in *V. viviparus* besitzen nicht nur die Funktion der Fortbewegung, sondern auch der Futtersammlung und müssen daher dort in großen Mengen vorhanden sein und sich gezielt in eine Richtung bewegen können. Die teilweise entdeckten

kugelförmigen Aufsätze auf den Cilien wurden als Artefakte der Fixierung interpretiert, als sogenannte „paddle cilia“, die Aufgrund der Fixierungsbedingungen entstehen können (Beninger, 1995).

Das Epithelium sondert eine Vielzahl von Stoffen ab, wie zum Beispiel anorganische Säuren, die Schale, Skleroproteine und Schleim (Simkiss, 1988). Bei Einbezug, dass *V. viviparus* in der Lage ist ein Schleimgewebe an ihrer Unterseite zu bilden, welches zur Nahrungsaufnahme dient, kann es durchaus in Betracht gezogen werden, dass die verschiedenen Vesikel und Vakuolen, verschiedene Sekrete produzieren, die verschiedene Funktionen ausüben. So könnten die verschiedenen Komponenten extrazellulär ein Gewebe in einem anderen Sekret bilden um das sogenannte Schleimgewebe zu bilden. Die Cilien sorgen daraufhin für eine Gleichverteilung des Schleims und die Bewegung des Schleimgewebes an der Unterseite der Schnecke.

Die andere Form des Epithels in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 5) könnte von einem anderen Bereich auf der Schnecke stammen, weshalb dieser Ausschnitt sich so stark von den anderen unterscheidet. Die Oberfläche ist hier vermutlich nur mit Mikrovilli bedeckt, weshalb sie rau erscheint, aber keine Cilien sichtbar sind. Die Erhebungen können ohne weitere Untersuchungen zunächst nur als Poren interpretiert werden. Untermuert wird dies mit dem vergleichbaren Abstand der Drüsenzellen in den TEM Aufnahmen und den Erhebungen der REM Aufnahmen, bei denen es sich vermutlich um Schleim handelt (Abb. 5). Im Allgemeinen ist es auch durchaus sinnvoll, dass die meisten entnommenen Proben vom Fuß und dessen Unterseite zu stammen scheinen, da das Exemplar der Probenentnahme am Deckel herausgezogen wurde, welcher fest mit dem Fuß verwachsen ist.

Um für die gefundenen Ausschnitte genauere Zuordnungen machen zu können, hätte das Exemplar besser präpariert werden müssen. So hätte man bei der Probenentnahme zuordnen müssen, an welcher Stelle Gewebe entnommen worden ist. Zudem könnte an verschiedenen Stellen Gewebe entnommen werden (Kopf, Mund, Sohle, Oberseite des Fußes, etc.), welches daraufhin auf seine morphologischen Merkmale verglichen werden könnte

(Abb. 9 fortgesetzt) zu sehen (ER?) B und C: Eine starke Vergrößerung der Oberfläche der Zellen zeigt, dass diese nicht nur mit Cilien, sondern auch mit Mikrovilli bedeckt ist. Die Cilien sind dicker und zeichnen sich durch einen dunklen Punkt in der Mitte aus. Die Skala entspricht 2,5 µm. D: Eine starke Vergrößerung der Cilien im Querschnitt zeigt eine typische 9x2 + 2-Struktur der Axoneme. E: Bei genauer Betrachtung der Vesikel kann man sehen, wie sich die Struktur dieser verliert und diese sich aufzulösen scheinen (Oval).

Danksagung

Unser herzlichster Dank geht an unsere Betreuer Prof. Thomas Stach und Peer Martin, da sie sich immer bemüht haben uns alles zu erklären und näher zu bringen, was wir für unseren Ausflug in die Elektronenmikroskopie brauchten. In den sehr kurzen vier Wochen waren sie immer da und haben unsere Fragen beantwortet und sind uns bei Problemen immer ohne zu zögern zur Hand gegangen. Durch euch haben wir in der kurzen Zeit doch sehr viel gelernt und hoffen uns das angelernte Wissen beizubehalten und bald wieder zu Nutze machen zu können.

Literatur

- Beninger P. G., Potter T. M., Saint-Jean S. (1995): Paddle cilia fixation artefacts in pallial organs of adult *Mytilus edulis* and *Placopecten magellanicus* (Mollusca, Bivalvia): Can. J. Zool. 73: 610-614
- Bubel, A. (1984): Mollusca: Epidermal cells. In J. Bereiter-Hahn, A.G. Mataltsy, and K.S. Richards (eds.): Biology of the Integument, Vol. I, Invertebrates. Springer-Verlag, 400-447.
- Buddenbrock, W. (1956): Vergleichende Physiologie: Band III Ernährung, Wasserhaushalt und Mineralhaushalt der Tiere. Springer basel AG.
- Fechter, R., Falkner, G. (1990): Steinbachs Naturführer – Weichtiere – Europäische Meeres- und Binnenmollusken: Mosaik-Verlag.
- Fretter, V., Graham, A. (1962): British Prosobranch Molluscs. Ray Society London.
- Graham, A. (1957): The molluscan skin with special reference to prosobranchs. Proc. Malacol. Soc. Lond. 32: 135-144.
- Harrison, F. W. (1994): Microscopic Anatomy of Invertebrates, Volume 5, Mollusca I: Wiley-Liss, Inc.
- Lewin, B. (2007): Cells: Jones and Bartlett Publishers.
- Machin, J. (1977): Role of integument in molluscs. In B.L. Gupta, R.B. Moreton, J.C.
- Oschman, and B.J. Wall (eds.). Transport of Ions and Water in Animals. Academic Press: 735-762.
- Park J., Lee J., Lee Y., Kim J. (2012): Micromorphology and Ultrastructure of the Foot of the Equilateral Venus *Gomphina veneriformis* (Bivalvia: Veneridae): CellBio, Vol. 1 1: 1-16.
- Prince, J. (2007): Opaline gland ultrastructure in *Aplysia californica* (Gastropoda: Anaspidea): Journal of Molluscan Studies.
- Simkiss, K. (1988): Molluscan skin (excluding cephalopods). In E.R. Trueman and M.R. Clarke (eds.): The Mollusca, Form and Function. Academic Press, 11: 11-35.

Ultrastrukturvergleich der Epidermisstruktur von terrestrischen (*Pomatias elegans*), Süßwasser- (*Viviparus viviparus*) und marinen (*Steromphala divaricata*) Gastropoden

al Jalali, Leonor; jalalile@hu-berlin.de

Segelitz, Patrick Steven; Patrick.Segelitz@gmx.de

Zusammenfassung

Diese Arbeit sollte durch vergleichende Betrachtung von Gastropodenepithelien Rückschlüsse auf Habitatspezifische Anpassungen ziehen. Hierbei lag der Fokus auf Vorkommen und Dichte von Mikrovilli sowie Zilien und der Abundanz sowie Variabilität von Drüsengeweben.

Die Epithelien der Arten *Pomatias elegans* (terrestrisch), *Viviparus viviparus* (aquatisch) und *Steromphala divaricata* (marin) wurden mittels Licht-, Rasterelektronen- und Transmissionselektronenmikroskopie miteinander verglichen.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Dichte von Mikrovilli bei der Sumpfdeckelschnecke *V. viviparus* größer ausfällt als bei der marinen Schnecke *S. divaricata*. Die Verteilung von Mikrovilli und Zilien variiert bei den betrachteten Arten stark mit der Lokalisierung des Gewebes.

Für *S. divaricata*, konnten fünf unterschiedliche Drüsengewebe beobachtet werden, wohingegen bei *P. elegans* und *V. viviparus* jeweils ein Drüsentyp beobachtet werden konnte.

Der direkte Vergleich des Fußes von *V. viviparus* und *S. divaricata* zeigte einen, das Epithel bedeckenden, Ziliensaum gleicher Dichte sowie eine Ausfüllung des Epithels mit Drüsenzellen ähnlichen Erscheinungsbildes. Dies deutet darauf hin, dass diese Struktur an der ventralen Seite des Fußes eine Anpassung an den mäßig umspülten Lebensraum (Brandungszone bei *S. divaricata*, sowie mäßig fließende Gewässer bei *V. viviparus*) beider Arten darstellt.

Einleitung

Die äußerste Zellschicht von Gastropoden, das Epithel, ist in andauerndem Kontakt mit der Umwelt und erfüllt mannigfaltige Aufgaben. Sie beherbergt Chemo- (Emery 1992) und Mechanorezeptoren (Crisp 2009), dient der Respiration (Graham 2015) sowie der Endozytose (Ryder 1977) und dem Austausch von Metaboliten (Simkiss 1988). Mit der Vielzahl an von Gastropoden bewohnten Habitaten geht auch eine Vielzahl von Umweltbedingungen einher, an die ein Gastropode angepasst sein muss.

Der Sauerstoffgehalt der Umgebung nimmt von Luft mit 260 mg/L zu Süßwasser mit 9,08 mg/L bei 20°C bis zu 7,38-7,60 mg/L bei Meerwasser mit einem Salzgehalt von 3-3,4% bei 20°C ab. Dies bedeutet, dass aquatische Gastropoden Mechanismen entwickeln müssen, um Sauerstoff effizienter aus ihrer Umgebung aufzunehmen, als dies bei terrestrischen Gastropoden der Fall ist. Ein möglicher Anpassungsmechanismus ist

die Vergrößerung der Epitheloberfläche durch Ausstülpungen der Epithelmembran, den sogenannten Mikrovilli. Hinzu kommt eine große Bandbreite in der Salinität der Umgebung, die gerade bei der Betrachtung von marinen Gastropoden bedacht werden sollte. 1981 beschrieb Schlichter, dass sich Ionen im Schleim von *Lymnaea stagnalis appressa* anreichern. Auch wenn es sich bei dieser Art um eine Süßwasserschlamm- oder Sumpfdeckelschnecke handelt, ist davon auszugehen, dass Schleim eine gewisse Rolle im Ionen- und Salzhaushalt von Gastropoden spielt.

Des Weiteren stellen aquatische Lebensräume durch ihre Strömungsmechaniken zusätzliche Ansprüche an die Lokomotion von Gastropoden denen terrestrisch lebende Gastropoden nicht ausgesetzt sind.

Der Mechanismus der Lokomotion ist hierbei stets ein Anheben und Vorschieben von Teilbereichen des Fußes, bei dem der Fußsaum stets in

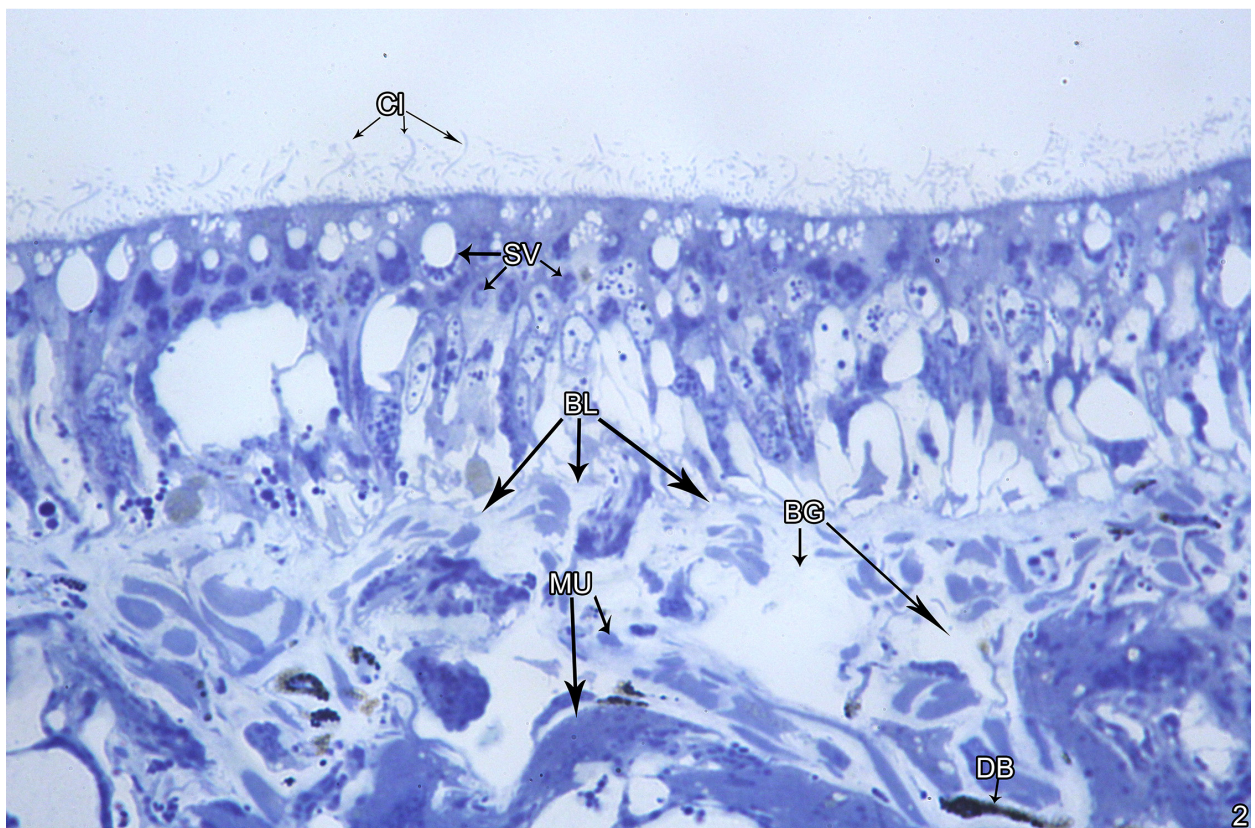
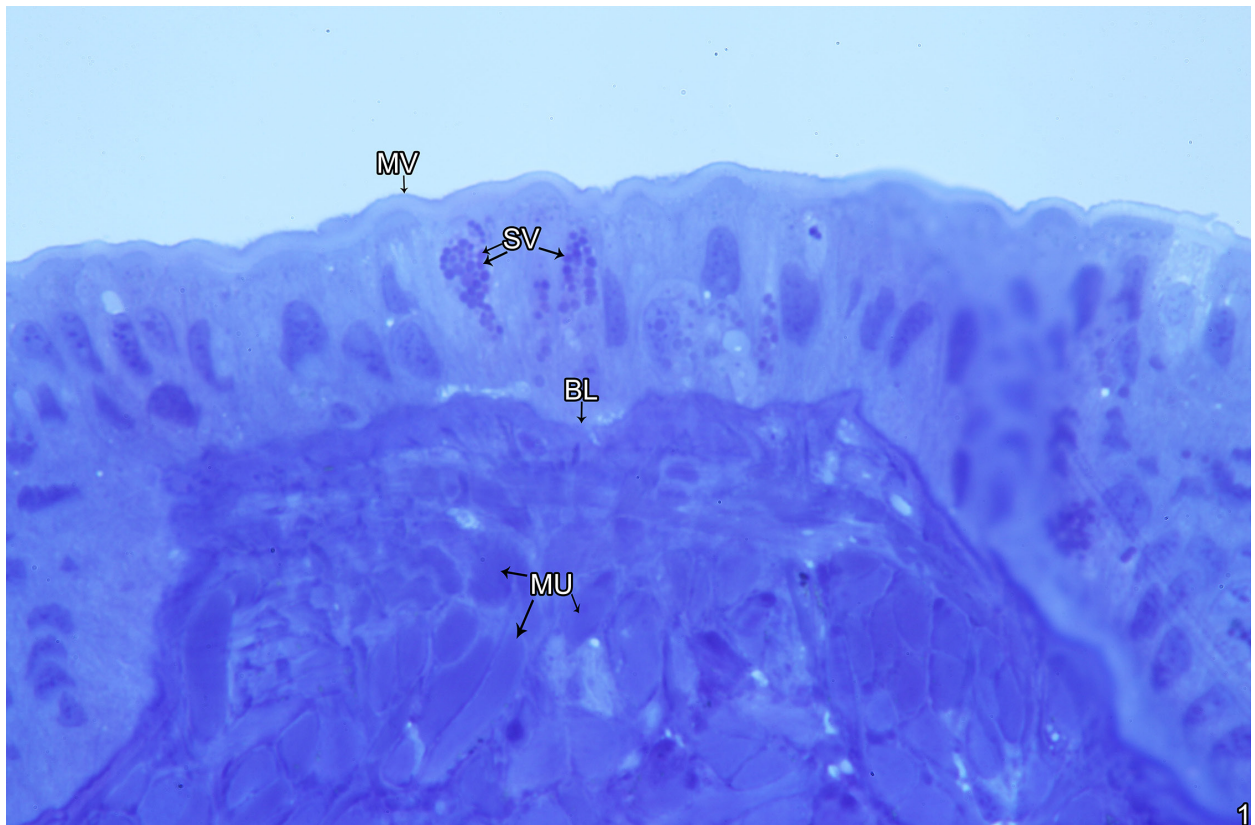


Abb. 1 & 2. Semidünnschnitt von *P. elegans* (1) und dem Fuß von *V. viviparus* (2) angefärbt mit 1% Toluidinblau bei einer Vergrößerung von 1:100. Erkennbar ist die Palisadenstruktur des Epithelgewebes, das zwischen dem Mikrovillisaum (MV) (1) bzw. den Zilien (2) und der Basallamina (BL) liegt. Im Inneren der Zelle sind distinkte, sekretorische Vesikel (SV) zu erkennen. Unterhalb der Basallamina liegt ein dichtes Gewebe aus Muskulatur (MU). „Dense-bodies“ (DB) sind nur bei *V. viviparus* zu beobachten (2).

Kontakt mit dem Substrat bleibt. Dadurch „zieht“ sich ein Gastropode vorwärts. Unterstützt wird dieser Vorgang durch einen ventral am Fuß gelegenen Ziliensaum der abgesonderten Schleim verteilt und zur Bewegung nutzt (Hawkins 1988). Diese motorischen Zilien besitzen wie alle motorischen Zilien von adulten Organismen eine 9x2+2 Struktur, wohingegen sensorische Zilien an dem fehlenden zentralen Mikrotubulipaar erkannt werden können.

Neben der Unterstützung der Lokomotion kann der Schleim der Gastropoden eine Vielzahl weiterer Funktionen erfüllen wie z. B. Reproduktion, Nahrungsaufnahme, Verteidigung und Schmierung (Denny 1983). So hat Von Byern (2017) durch ultrastrukturelle und histochemische Untersuchungen fünf verschiedene Drüsentypen in der Landschnecke *Cepaea hortensis* finden können, während Wondrak 2012 bei Individuen der Gattung *Arion* sechs unterschieden hat. Für marine Arten werden generell mehrere verschiedene Drüsentypen beschrieben. So z. B. sechs Arten in *Acmaea tessulata*, neun bei *Patella vulgata* und zehn in *Littorina irrorata* (Greifstorfer 2017). Hierbei kann sich das Auftreten der einzelnen Drüsentypen lokal stark unterscheiden. Im ventralen Fußbereich von *Acmaea* wurden beispielsweise alle sechs Drüsentypen beschrieben während bei *Littorina* nur drei von neun Drüsentypen beschrieben (Greifstorfer 2017).

Gastropoden-Mucus besteht in der Regel aus Protein-Polysaccharid-Komplexen, welche entweder neutral oder sauer und unterschiedlich geladen sein können. Die Polysaccharide, welche aus verketteten Disacchariden wie bei einem Glycosaminoglykan zusammengesetzt sind, werden in dem Kontext auch als Mucopolysaccharide bezeichnet. Der pH-Wert, die Ladung und das Kohlenhydrat zu Protein Verhältnis entscheiden hierbei über die Funktionalität.

Neben diesen Schleimdrüsen existieren auch Calcium- und Pigmentdrüsen (Barr 1927), die beobachtet werden könnten.

Verglichen werden hier *Pomatias elegans*, *Viviparus viviparus* und *Steromphala divaricata*. *P. elegans* gehört zu den Landdeckelschnecken (Pomatiasidae), benötigt kalkhaltige Böden und ist vergleichsweise wärmebedürftig. Sie ernährt sich von abgestorbener organischer Materie (Wenz 1923). *V. viviparus* gehört zu den Sumpfdeckelschnecken (Viviparidae) und lebt in mäßig

fließenden Gewässern. Zu ihrer Nahrung zählen sowohl Algen als auch Detritus (Glöer 2002). *S. divaricata* gehört zu den Kreiselschnecken (Trochidae), lebt überwiegend im Litoral und ernährt sich als Herbivore ebenfalls von Detritus und Algen (Poutiers 1998).

Es wurde erwartet, dass *P. elegans* als terrestrisch lebender Organismus im Vergleich zu den aquatisch lebenden Vertretern *V. viviparus* und *S. divaricata* eine geringere Mikrovillidichte besitzt, da Austrocknung in terrestrischen Habitaten ein größeres Risiko darstellt als respiratorische Inhibition. Hierbei sollte die Mikrovillidichte von *V. viviparus* zu *S. divaricata* aufgrund der sinkenden Sauerstoffkonzentration im umgebenden Medium weiter zunehmen.

Aufgrund des steigenden Anspruchs an den motorischen Apparat in aquatischem Medium wurde außerdem erwartet, dass *V. viviparus* und *S. divaricata* eine größere Anzahl unterschiedlicher Drüsentypen aufweisen als *P. elegans*. In Übereinstimmung mit Greifstorfer (2017) wurde vor allem im Fuß der Gastropoden mit großen Unterschieden der Drüsenstrukturen gerechnet. Einhergehend mit den aquatischen Lebensräumen und den nur mäßigen Strömungen, denen *V. viviparus* und *S. divaricata* ausgesetzt sind, wurde erwartet, dass diese mehr motorische Zilien aufweisen als *P. elegans*, sich jedoch untereinander nicht unterscheiden.

Material und Methoden

Individuen

Die verwendeten Individuen waren *P. elegans*, *V. viviparus* und *S. divaricata*. *P. elegans* wurde in Kroatien gesammelt, *V. viviparus* wurde im Tegeler Fließ gesammelt und *S. divaricata* wurde im adriatischen Meer gesammelt. Von jeder Art wurde je ein Individuum für die Analyse verwendet.

Probenvorbereitung

Die Gehäuse von *P. elegans* und *S. divaricata* wurden durch vorsichtige, stumpfe Gewalteinwirkung zerbrochen. Nach dem Entfernen des

Gehäuses wurden Teile des Kopfes und Fußes in Stücke mit einer Kantenlänge von ca. 1 cm zerteilt. *V. viviparus* wurde präpariert, indem der Kopf durch Zug am Operculum freigelegt wurde. Hier wurden ebenfalls Schnitte mit einer Kantenlänge von ca. 1 cm angefertigt.

Primärfixierung

Für die Primärfixierung wurde 25% Glutaraldehyd-Lösung (Electron Microscopy Sciences, USA) in destilliertem Wasser und 0,2M Phosphatpuffer auf 2,5% verdünnt. Der Phosphatpuffer wurde mit Natriumdihydrogenphosphat (Electron Microscopy Sciences, USA) und destilliertem Wasser frisch angesetzt.

Die Proben wurden in dieser Glutaraldehyd-Lösung für eine Stunde primärfixiert. Das Primärfixativ wurde anschließend mit auf 0,1 M verdünnten Phosphatpuffer in 4 Waschgängen á 10 Minuten ausgewaschen. Die primärfixierten Präparate wurden in 0,1M Phosphatpuffer für eine Nacht eingelagert. Das Fixativ für *S. divaricata* wurde zusätzlich mit Natriumchlorid auf 1000 mOsm eingestellt, um den Puffer an die Osmolarität des Gewebes anzupassen.

Sekundärfixierung

Für die Sekundärfixierung wurde 4% Osmiumtetroxid-Lösung (Electron Microscopy Sciences, USA) in 0,1M Phosphatpuffer auf 1% verdünnt. Die Sekundärfixierung der Proben erfolgte umgehend nach der Primärfixierung durch Austausch des Primerfixatives mit der Osmiumtetroxid-Lösung. Die Proben inkubierten in der Osmiumtetroxid-Lösung für 30 Minuten. Das Osmiumtetroxid wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit destilliertem Wasser aus der Probe entfernt.

Entwässerung

Die Proben wurden über eine aufsteigende Alkoholreihe (2x30%, 50%, 70% je 10 Minuten) in 70% Alkohol überführt. Nach einer Nacht Inkubationszeit wurden die Proben in einer weiteren aufsteigenden Alkoholreihe (80%, 90%, 2x100% je 10 Minuten) in 100% Alkohol überführt.

Einbettung in Araldit

Die Einbettung in festes Medium für die transmissionselektronenmikroskopische (TEM)

Analyse wurde mit Epoxidharz Araldit CY 212 durchgeführt. Die Proben wurden in einer aufsteigenden Araldit CY 212 :Propylenoxid (1:3, 1:1, 3:1 je 1h) und anschließend über Nacht in reinem Araldit CY 212 inkubiert, um zu gewährleisten, dass die gesamte Probe von Araldit CY 212 durchzogen ist. Anschließend wurde eine härtende Araldit M Lösung bestehend aus Araldit CY 212, Härter HY964 und BDMA als Polymerisationsstarter im Verhältnis 1:1:0,6 angesetzt. Mit dieser Lösung wurden kleine Böden in die entsprechenden Formen vorgegossen, um ein Absinken der Probe auf den Boden der Form zu verhindern. Die Proben wurden auf diesen Böden ausgerichtet und mit der härtenden Araldit M Lösung überschichtet und bei Bedarf erneut ausgerichtet. Das Aushärten fand bei 60°C über 48 h statt.

Die für das Rasterelektronenmikroskop (REM) vorgesehenen Proben wurden in einem Kritischer-Punkt-Trockner CPD 030 mittels Kritisches-Punkt-Trocknung durch Kohlenstoffdioxid von Feuchtigkeitsresten befreit. Die getrockneten Proben wurden mittels Klebestreifen auf Aluminiumstubs fixiert und anschließend in einem Sputter Coater mit Gold bedeckt. Zur Betrachtung der Proben wurde ein LEO 1430, betrieben mit 15 kV, und der dazugehörigen Software verwendet.

Semidünnschnitte wurden mit einem Glasmesser in einem Leica Ultracut S angefertigt, auf einem Objektträger bei 60°C hitzefixiert und mit Toluidinblau (Toluidinblau:Borax:dest. Wasser 1:2:100) angefärbt. Die so angefärbten Schnitte wurden mittels Lichtmikroskop untersucht, um eine geeignete Stelle für die Ultradünnschnitte zu wählen.

Die Ultradünnschnitte wurde mit einem Diamantmesser angefertigt und auf 1 mm Grids beschichtet mit Formvar aufgetragen und mit 4 %igen Uranylacetat (Electron Microscopy Sciences, USA) für 10 Minuten sowie anschließend in Bleicitrat (Electron Microscopy Sciences, USA) für 5 Minuten kontrastiert. Die Bilder der kontrastierten Proben wurden mit einem Zeiss EM900 bei 50kV mit der zum Gerät gehörenden Software aufgenommen.

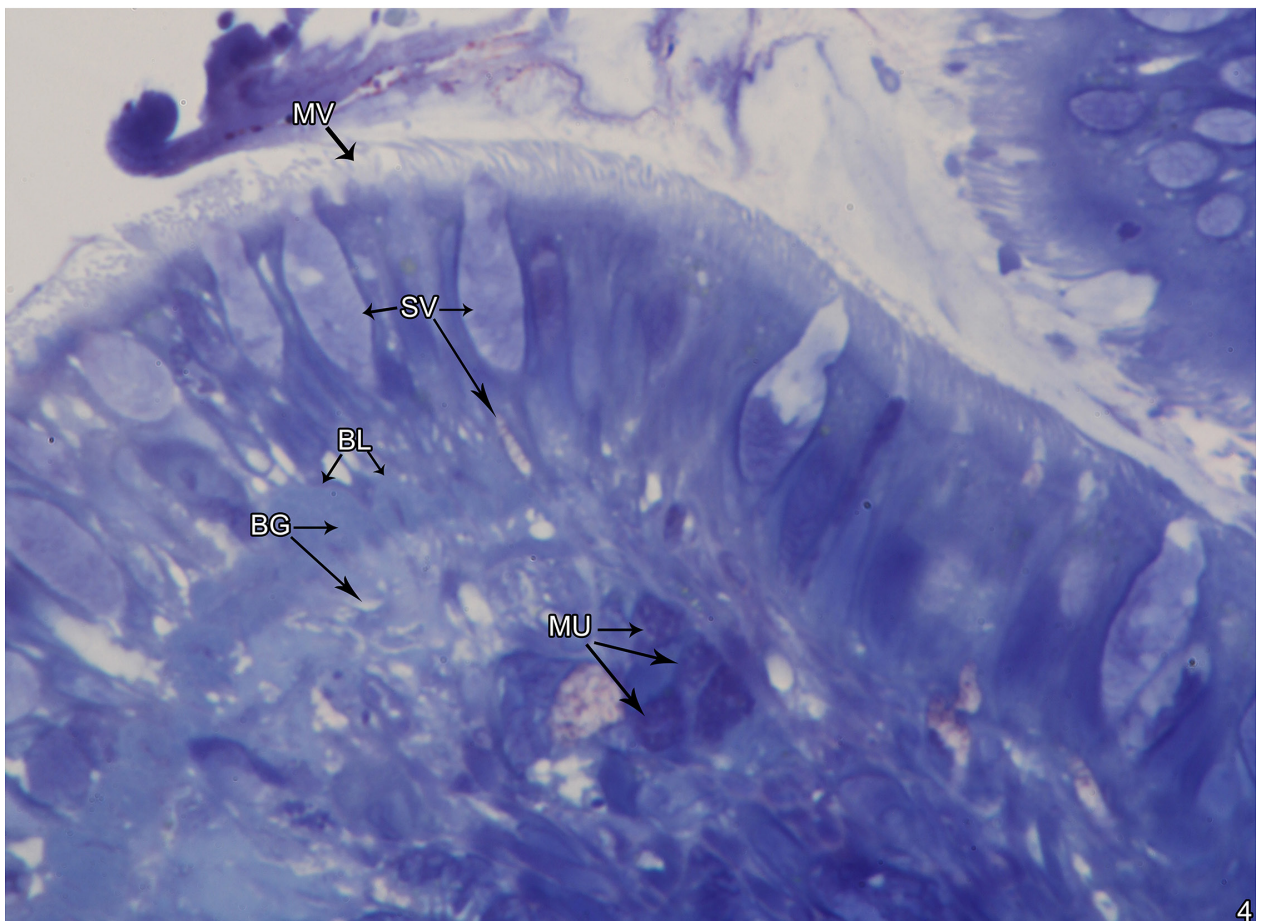
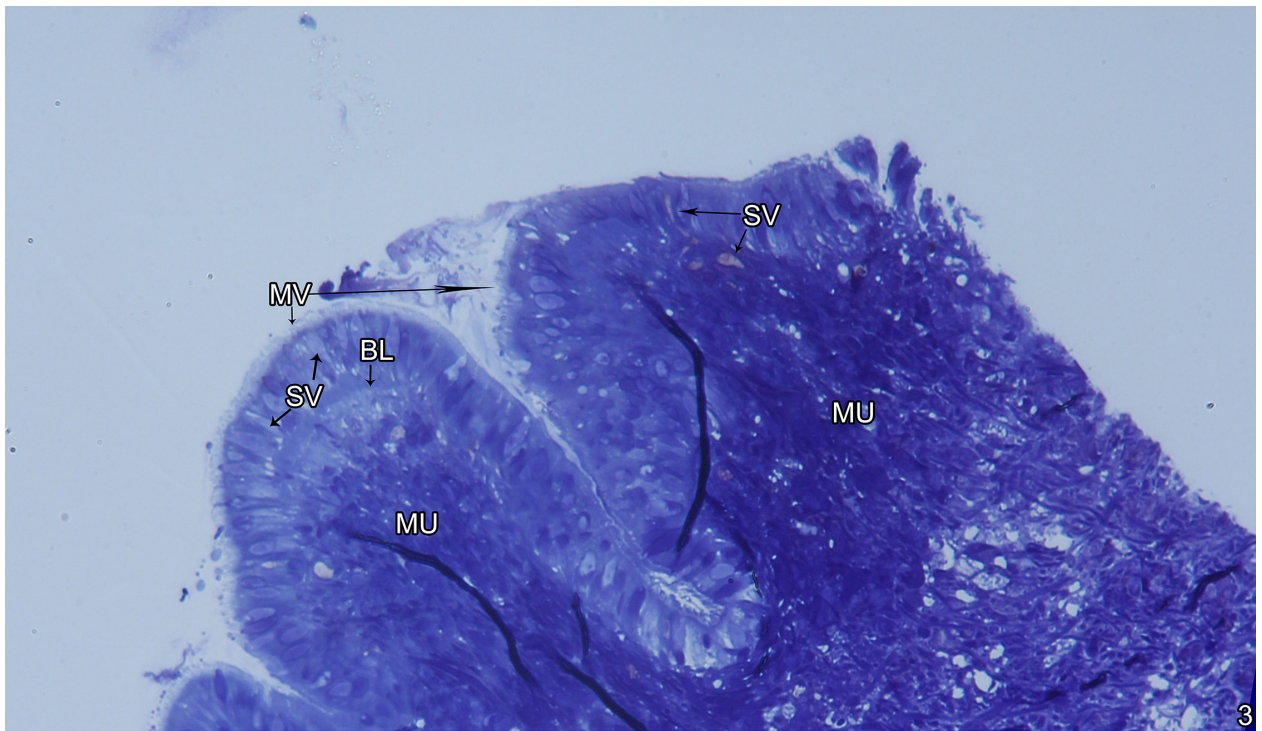


Abb. 3 & 4. Semidünnschnitt vom Fuß von *S. divaricata* eingefärbt mit 1% Toluidinblau bei einer Vergrößerung von 1:40 (3) und 1:100 (4). Die Palisadenstruktur des Epithelgewebes, das zwischen den Zilien (CI) und der Basallamina (BL) liegt, ist erkennbar. Flächige Strukturen mit sekretorischen Vesikeln (SV) sind zu erkennen. Unterhalb der Basallamina liegt die in Bindegewebe (BG) eingebettete Muskulatur (MU).

Ergebnisse

Lichtmikroskopische Betrachtung der Semidünnschnitte

Das Epithel von *P. elegans* besteht aus einer einzelnen Schicht hoher, palisadenförmiger Zellen und besitzt eine pinselartige Oberflächenstruktur bestehend aus kurzen, sehr dicht gepackten Mikrovilli, die nicht durch sensorische oder motorische Cilien durchbrochen werden (Abb. 1). Die Mikrovilli haben ihren Ursprung in Zellen, die zur Hälfte mit Schleimvesikeln ausgefüllt sind. Diese Vesikel sind lose angeordnet, haben eine relativ einheitliche, rundliche Form und eine starke orthochromatische, d.h. blaue Färbung. Unterhalb dieser Mucus produzierenden Zellen liegt abgegrenzt durch die Basallamina die schräge Muskulatur, welche ebenfalls stark blau eingefärbt ist, eingebettet in Extrazelluläre Matrix (Abb. 1).

V. viviparus zeigt ein Epithel, das aus zum Großteil palisadenförmigen Zellen besteht, die zum Teil aber auch eine bauchige Struktur, ausgefüllt mit einem hellen Raum, annehmen können. Dabei zeigt sich das Gewebe unterhalb der Epithelzellen als auffallend heterogen eingefärbt (Abb. 2). Hier liegen die orthochromatisch gefärbten, schräg verlaufenden Muskelzellen mit vereinzelt „dense bodies“ im Bindegewebe eingebettet. Dieses ist durch hell erscheinende sowie granuläre Strukturen charakterisiert. Dem Epithel ist ein Ziliensaum aufgelagert. Die Schleimvesikel füllen hingegen einen wesentlich größeren Teil der Epithelzellen aus (ca. 70-80 %). Dabei lassen sich zwei unterschiedliche Typen beschreiben; der Erste zeigt sich stark blau eingefärbt, rundlich und klein, während der Zweite bedeutend größer und fast weiß erscheint (Abb. 2).

S. divaricata (Bild 3) besitzt einen ausgeprägten, dicht gepackten Mikrovillisaum der eine palisadenförmige Zellschicht bedeckt, hinter der sich das Bindegewebe mit eingebetteter Muskulatur anschließt (Abb. 3 u. 4). Dieser ist in sehr stark gefärbten Bereichen nur als Pinselstruktur erkennbar. Die Epithelzellen sind mit großen Schleimvesikeln ausgefüllt und das Austreten von Mucus aus dem Epithel kann an mehreren Stellen beobachtet werden. Die sich dem Epithel anschließende schräge Muskulatur ist stark orthochromatisch gefärbt. Es zeigen sich hier aber auch metachromatisch, d.h. violett, eingefärbte Bereiche (Abb. 4).

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM-Aufnahmen)

P. elegans zeigt ebenfalls eine palisadenförmige Epithelzellstruktur mit Mikrovillisaum. Das palisadenförmige Gewebe hat eine Länge von ca. 17 μm gemessen von der Spitze der Mikrovilli. Die Mikrovilli sind ca. 1,6 μm lang und ca. 0,1 μm dick. Der Mikrovillisaum ist ca. 10 Mikrovilli/ μm Dicht. Die Breite der einzelnen Zellen ist aufgrund wiederholt auftretender Freiräume nicht messbar. Die Mikrovilli sind von einer Netzstruktur überlagert. In einem Abstand von ca. 12 μm zur Spitze des Mikrovillisaums ist ein Zellkern erkennbar, der eine Länge von ca. 4,7 μm und eine Breite von ca. 1,5 μm hat. (Abb. 5)

V. viviparus zeigt die palisadenförmige Struktur der Epithelzellen, wobei diese ausgefranst erscheint. Unterhalb der Palisadenstruktur liegt das Bindegewebe als filamentöse Struktur. Auf der Oberfläche der Epithelzellen ist ein dichter Ziliensaum, auf dem in unregelmäßigen Abständen Netzstrukturen existieren. Die Länge der Epithelzellen, gemessen vom Ansatz des Ziliensaums bis zum Bindegewebe, beträgt ca. 15 μm . Die Zilien sind ca. 8 μm lang und ca. 0,2 μm dick. (Abb. 6)

Die Palisadenstruktur des Epithelgewebes von *S. divaricata* ist gut erhalten und der Übergang zum Bindegewebe klar erkennbar. Im unteren, rechten Bildviertel ist das Bindegewebe von den Epithelzellen gelöst. Die Mikrovilli haben eine Länge von ca. 3,5 μm bei einer Dicke von ca. 0,1 μm und erscheinen teilweise gekrümmt. Der Mikrovillisaum besitzt eine Dichte von 5 Mikrovilli/ μm . Auf der Oberfläche der Mikrovilli sind intakte Vesikel sowie netzartige Strukturen zu erkennen. Die Epithelzellen messen von der Spitze des Mikrovillisaums bis zum Ansatz des Bindegewebes ca. 14 μm bei einer Breite von ca. 2 μm . In einem Abstand von ca. 9 μm zur Spitze des Mikrovillisaums ist ein Zellkern mit einer Länge von ca. 3,8 μm und einer Breite von ca. 1,8 μm zu erkennen. (Abb. 7)

Ausgetretene Vesikel die auf der Epidermis lokalisiert sind, konnten bei *S. divaricata* nachgewiesen werden (Abb. 8 u. 9). Diese haben eine relativ einheitliche, rundliche Form und viele sind an einigen Stellen eingedellt. Sie sind zahlreich, jedoch nicht gleichmäßig über das

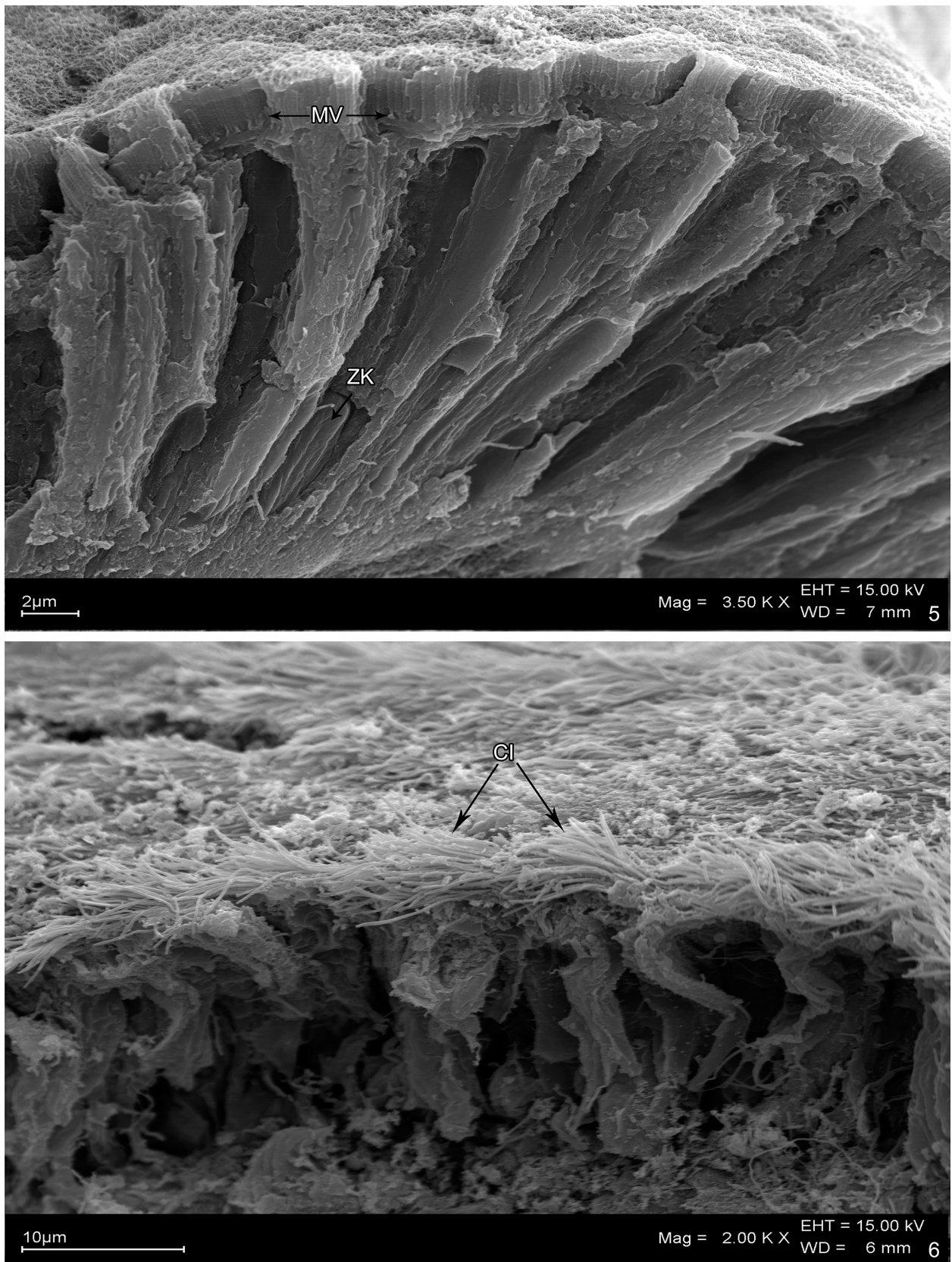


Abb. 5 & 6. REM-Aufnahme von *P. elegans* bei 3.500-facher (5) und vom Fuß von *V. viviparus* bei 2.000-facher (6) Vergrößerung. Die Mikrovilli (MV) von *P. elegans* sind als stäbchenförmige Gebilde unterhalb einer Netzstruktur erkennbar. Das Innere der Epithelzellen fehlt zum Großteil, ein Zellkern (ZK) ist erkennbar (5). Die Zilien (CI) liegen dem Epithel von *V. viviparus* wie Haare auf. Die Struktur der Epithelzellen ist nicht erhalten geblieben (6).

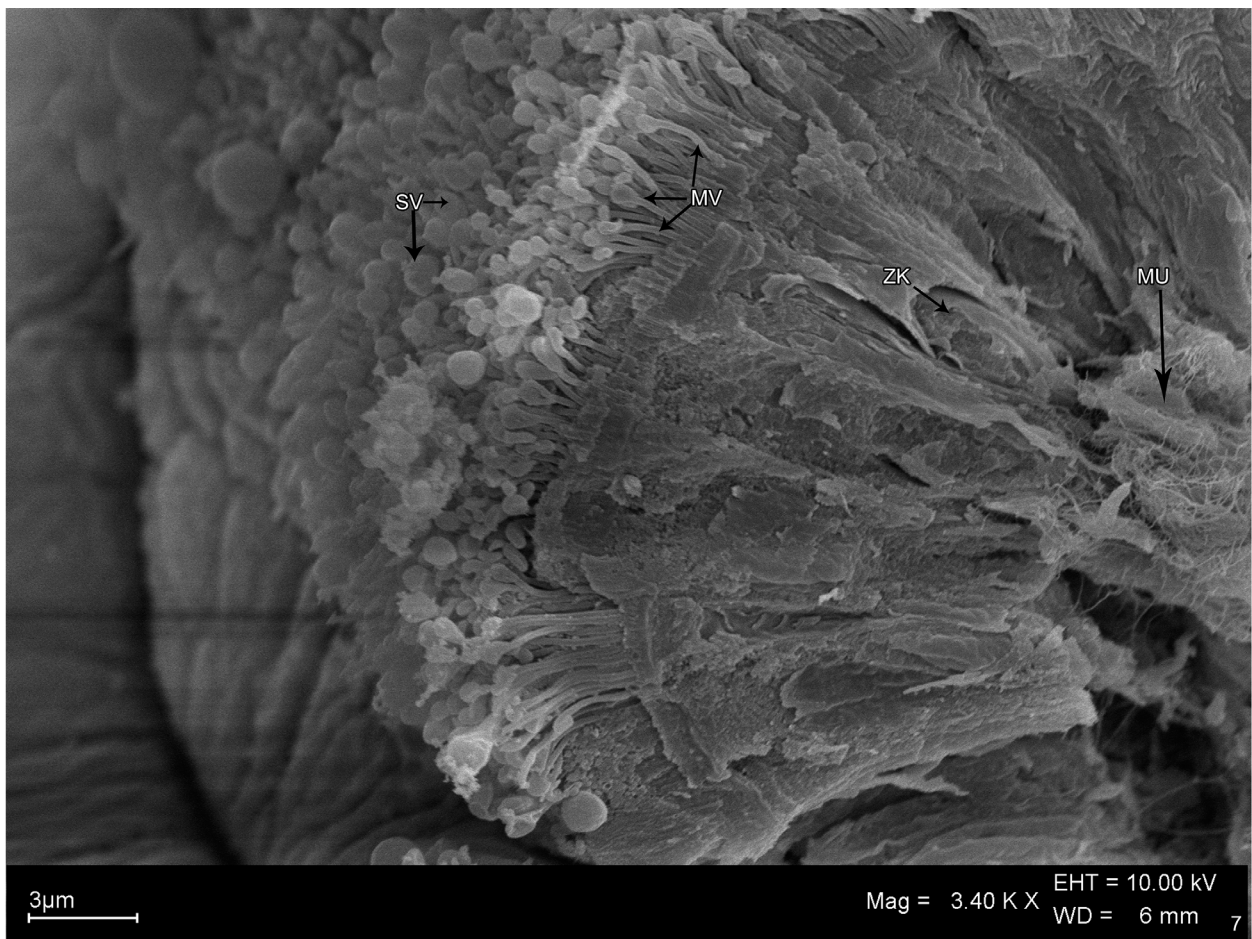


Abb. 7. REM-Aufnahme vom Fuß von *S. divaricata* bei 3.400-facher Vergrößerung. Der Mikrovillisaum (MV) ist gut erkennbar und scheint von sekretorischen Vesikeln (SV) bedeckt zu sein. Die Struktur der Epithelzellen sowie ein Zellkern (ZK) sind gut erhalten. Subepithelial befindet sich Muskelgewebe (MU).

Epithel verteilt. Ihre Größe variiert beträchtlich von 0,2 – 4,0 μm .

Selbst nach Austritt aus den Epidermiszellen sind sie noch weitestgehend intakt, an einigen Stellen ist des Weiteren eine netzartige Struktur zu beobachten (Abb. 8).

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen (TEM-Aufnahmen)

Bei der detaillierten Betrachtung des Epithelgewebes von *P. elegans* (Abb. 10) zeigt sich, dass die Mikrovilli eine Länge von 1,5 μm und eine Breite von 0,1 μm haben. Die Dichte des Mikrovillisaums liegt bei ca. 6,5 Mikrovilli/ μm . In einem Abstand von ca. 2,8 μm zur Spitze der Mikrovilli befindet sich ein Gürteldesmosom, welches die beiden benachbarten Zellen miteinander verbindet. Die Vesikel variieren in ihrem Erscheinungsbild: kleine Vesikel sind annähernd rund mit einem Radius von ca. 0,8 μm während größere Vesikel eher oval sind bei einer Länge von ca. 2 μm und einer Breite von ca. 1,4 μm . Der Zellkern beginnt ca. 17,5 μm entfernt vom

Mikrovillisaum und hat eine Länge von 4,8 μm und eine Breite von 2,1 μm . Das untere Ende des Zellkerns ist ca. 3,8 μm von der Basallamina entfernt. Die Zelle ist insgesamt ca. 26 μm lang. *V. viviparus* zeigt bei starker Vergrößerung (Abb. 11) keine deutlich erkennbaren Zell-Zell-Grenzen wodurch die Struktur der Epithelzellen nicht bewertet werden kann. Oberhalb der Basallamina befinden sich vakuoläre Lumen, die den unteren Teil der Zellen bis zu einem Abstand von ca. 14 μm zur Basallamina komplett ausfüllen. Die Zellkerne sind unregelmäßig geformt mit länglichen Auswüchsen. Sie liegen mittig in der Zelle und ihr Inneres besteht aus einer heterogenen Masse aus abwechselnd elektronendurchlässigerem und -dichterem Material. Oberhalb des Zellkerns befinden sich sekretorische Vesikel. An der Oberfläche des Epithelgewebes treten Zilien hervor in einer Dichte von ca. 7 Zilien/ μm . Die Epithelzellen haben eine Länge von ca. 36 μm , die Breite lässt sich aufgrund der fehlenden Zell-Zell-Grenzen nicht bestimmen. Die vom Binde-

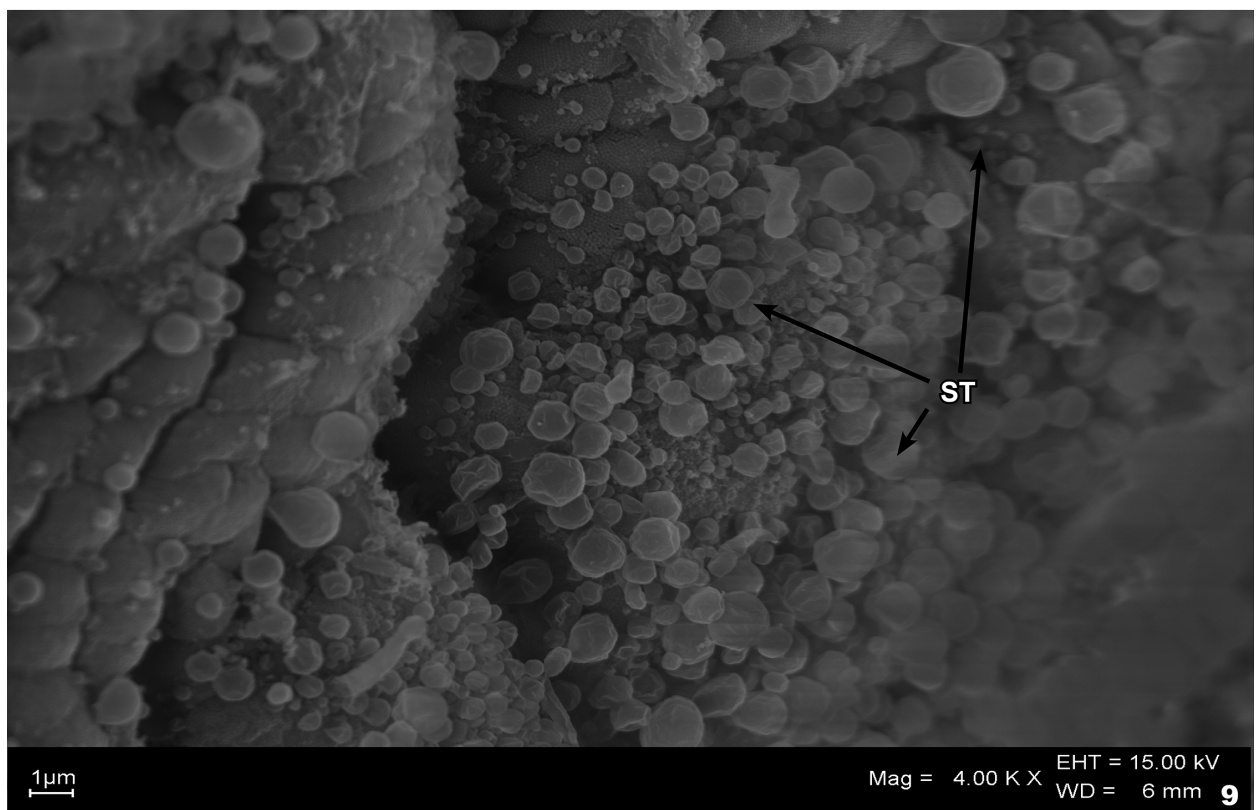
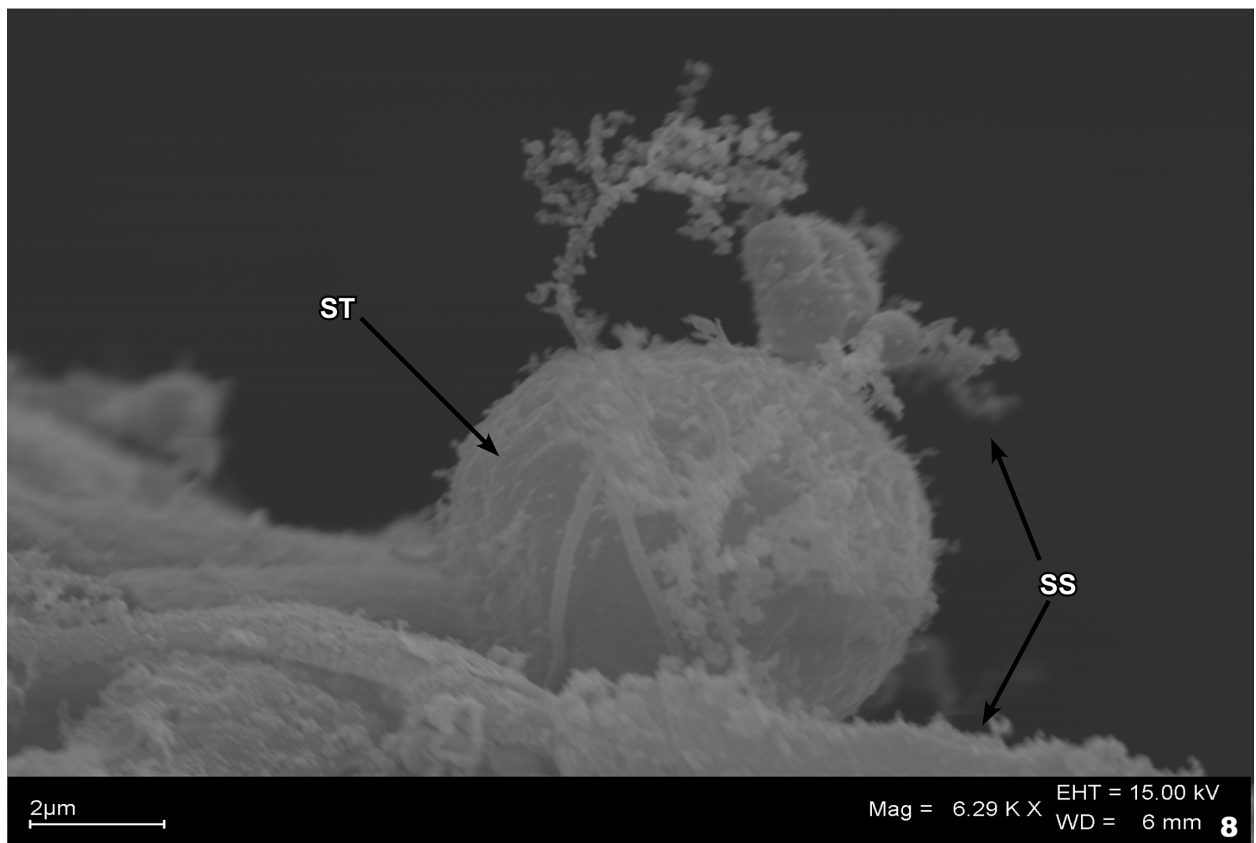


Abb. 8 & 9. REM-Aufnahme der Epidermis des Fußes von *S. divaricata* mit auf dem Epithel aufliegenden Schleimtröpfchen (ST) und einer Schleimschicht (SS) (8). Die Tröpfchen liegen noch in ihrer rundlichen, meist etwas eingedellten, Form erhalten auf der Epidermis auf.

Tabelle 1. Auflistung der Eigenschaften der Vesikel der beschriebenen Drüsenzelltypen bei *V. viviparus*, *S. divaricata* und *P. elegans*. Die Bezeichnung folgt hierbei dem Gattungsnamen sowie einer nachfolgenden Nummerierung. Unterschieden wurde in Gestalt, Dichte, Fülle und Elektronendichte der Vesikel.

Drüsentyp	S1	S2	S3	S4	S5	P1	V1
Vesikelform	polygonal	ellipsoid	nicht erkennbar	rundlich	eingefaltet / rundlich	eingefaltet / rundlich	polygonal / rundlich
Vesikeldichte	dicht	weniger dicht	Zelle ausfüllend	weniger dicht	weniger dicht	weniger dicht	weniger dicht
Vesikelfüllung	homogen	homogen	granulär	homogen	granulär / homogen	granulär / homogen	granulär / homogen
Elektronen- dichte der Vesikel	+ / ++	++	+ / ++	-	- / +	- / +	+ / ++

gewebe umschlossenen Muskelfasern besitzen nahezu runde Zellkerne von einem Durchmesser von ca. 1,45 μm .

Starke Vergrößerungen von *S. divaricata* (Abb. 12) zeigen sehr homogene Zellstrukturen mit schlecht erkennbaren Zell-Zell-Grenzen. Oberhalb der Basallamina befinden sich zum Teil stark ausgeprägte vakuoläre Lumen, deren exakte Positionierung unterhalb des Zellkerns ebenso wie ihre Größe variiert. Das Innere der Zellkerne besteht aus einer heterogenen Masse aus abwechselnd elektronendurchlässigerem und -dichterem Material. Hierbei überwiegt die Menge an elektronendurchlässigerem Material. Oberhalb der Zellkerne befinden sich erneut vesikuläre Strukturen bestehend aus elektronendichtem und elektronendurchlässigem Material. Oberhalb der Epithelzellen sind Zilien zu erkennen die eine Dichte von ca. 7 Zilien/ μm besitzen. Aufgrund der großen Varianz bei Kern- und Zellmorphologie in der Aufnahme wurde auf ein Vermessen dieser Komponenten verzichtet. Das Epithelgewebe besitzt eine Länge von ca. 45 μm von Basallamina zu Peripherie.

Eine zweite Gewebeprobe von *S. divaricata* (Abb. 13) besitzt einen ausgeprägten Mikrovillisaum auf der Oberfläche des Epithelgewebes. Unterhalb der Mikrovilli sind keine sekretorischen Vesikel zu erkennen. Die Zellkerne liegen basal oberhalb der Basallamina und haben ein heterogenes Inneres. Die Mikrovilli sind ca. 1,8 μm lang und ca. 0,1 μm breit. Die Mikrovillidichte liegt bei ca. 5 Mikrovilli/ μm

Eine Nahaufnahme der Zell-Zell-Grenze von *V. viviparus* zeigt, dass die Zellmembran von Membran Innen- bis Außenseite 0,1 μm dick ist (Abb. 14). Der Extrazelluläre Raum ist an der

dicksten Stelle 177 μm breit. Die Membran der benachbarten Zelle ist ebenfalls 0,1 μm dick.

Bei den verglichenen Arten kann man unterschiedliche Drüsenzelltypen vor Allem auf Grund der Gestalt, Dichte, Fülle und Elektronendichte ihrer Vesikel charakterisieren. Dabei haben wir die Bezeichnung der jeweiligen Drüsentypen so gewählt, dass auf den Anfangsbuchstaben des Gattungsnamen die Nummerierung folgt. In Tab.1 sind die genutzten Unterscheidungsmerkmale zu den charakterisierten Drüsenzellen aufgelistet.

Es konnten bei dieser vergleichenden Studie 5 Typen von Drüsenzellen an Hand der gewählten Charakteristika Gestalt, Dichte, Füllung und Elektronendichte ihrer Vesikel unterschieden werden: S1 ist dicht gepackt mit fast polygonal geformten Sekretvesikeln, welche heterogen, jedoch tendenziell elektronendurchlässig sind (Abb. 15). S2 ist lockerer gepackt mit ellipsoid geformten Vesikeln, die mit deutlich elektronendichterem Material gefüllt sind (Abb. 15). S3 ist großflächig granulär gefüllt mit einzelnen elektronendichten Teilen (Abb. 15), während S4 fast transluzente, vakuolenartige Sekretvesikel besitzt (Abb. 16). Die als S5 (Abb. 22) betitelten Drüsen scheinen mit zwei Arten von Vesikeln gefüllt zu sein. Die erste ist mit fast komplett elektronendurchlässigem Material gefüllt, ähnlich wie bei S4. Nur ganz schwach ist bei einigen Vesikeln eine granuläre Struktur zu erahnen. Die andere ähnelt einem Mitochondrium, ist aber sehr unregelmäßig eingefaltet und heterogen elektronendicht (siehe auch Abb. 21).

Für *V. viviparus* und *P. elegans* haben wir nur einen Typus differenzieren können: V1, welcher die gleichen Attribute wie S5 vorweist (Abb. 22)

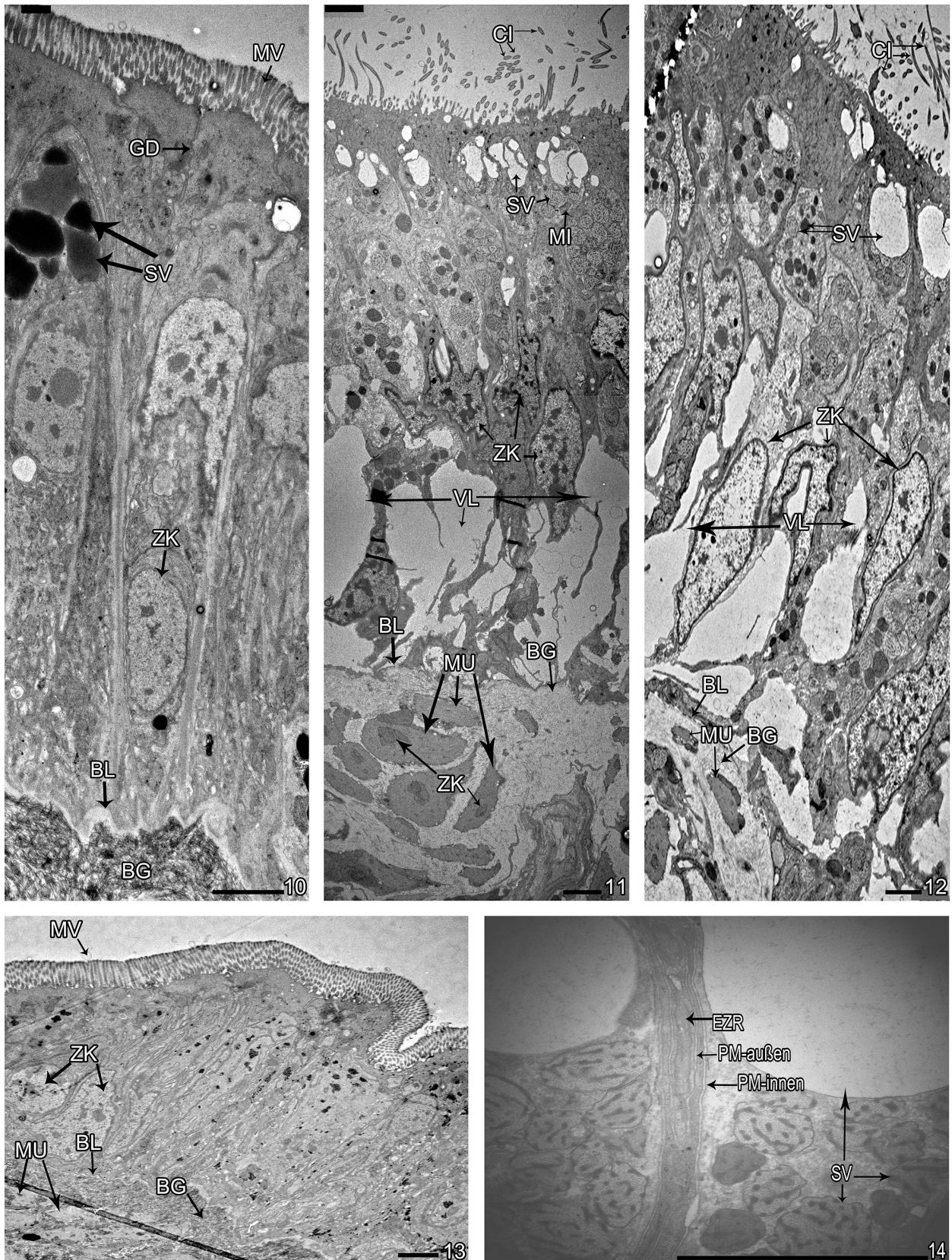


Abb. 10 - 14. Vergleich der Epithelzellstrukturen von *P. elegans* (10) *V. viviparus* (11 u. 14) und *S. divaricata* (12 u. 13) mittels TEM-Aufnahmen. Die dem Epithel aufliegenden Mikrovilli von *P. elegans* (Abb. 10) und *S. divaricata* (13) sowie Zilien von *V. viviparus* (11) und *S. divaricata* (Abb. 12) sind deutlich zu erkennen. Sekretorische Vesikel (SV) zeigen sich in unterschiedlicher Form und Elektronendichte (10-14). Die basal-liegenden Zellkerne (ZK) sind entweder uniforme, längliche Strukturen (10) oder besitzen Ausstülpungen (11 u.12). Unterhalb der Zellkerne können vakuoläre Lumen (VL) beobachtet werden (11 u.12). Die Basallamina ist als elektronendurchlässiger „Faden“ zu erkennen (10-13). Das sich anschließende Bindegewebe (BG) ist stark granular (10), oder homogen und elektronendurchlässig (11 u. 12). Die Muskulatur (MU) setzt sich deutlich vom Bindegewebe ab (11-13) und zeigt Kernstrukturen (12). Gürteldesmosome (GD) sind nahe der Spitze von *P. elegans* erkennbar (10). Die innere (PM-innen) sowie äußere Schicht (PM-außen) der Plasmamembran (Fortsetzung nächste Seite)

und P1, gefüllt mit sehr heterogenen, elektronendichten und -durchlässigen Vesikeln, welche eine polygonale Gestalt haben (Abb. 17 u. 18).

Subepithelial lokalisierte Drüsenzellen vom Typus S1 konnten ebenfalls bei *S. divaricata* identifiziert werden. Diese sind eng von den Zisternen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und vom Golgi-Apparat umgeben (Abb. 19). Auf Abbildung 20 lassen sich die Axoneme mit ihrer klassischen 9x2+2 Anordnung über die elektronendichteren Flecken am Rand und in der Mitte des Querschnittes erkennen.

Diskussion

Wir haben die Gastropoden-Arten *V. Viviparus*, *P. elegans* und *S. divaricata* als Vertreter der verschiedenen Habitate Süßwasser, Meer und Land ausgewählt und ihre Epidermis mit Licht- sowie Elektronenmikroskopischen Techniken betrachtet. Dabei sind wir im Besonderen auf Zellfortsätzen sowie Drüsenzellen eingegangen und haben diese im vorangegangenen Abschnitt auf zellulärer Ebene beschrieben. Nun wollen wir darauf aufbauend eventuelle Unterschiede zwischen den Arten vergleichend besprechen.

Es wurde erwartet, dass aquatisch lebende Gastropoden einen dichteren Mikrovillisaum besitzen um den geringeren Sauerstoffgehalt ihres Lebensraumes (260 mg/L in Luft zu 7,38-7,60 mg/L in Salzwasser) auszugleichen. Entgegen dieser Erwartungen besitzt *S. divaricata* nach Auswertung der REM-Bilder nur etwa 5 Mikrovilli/ μm während *P. elegans* etwa 10 Mikrovilli/ μm besitzt. Die TEM-Bilder zeigen eine geringere Differenz von 5 Mikrovilli/ μm bei *S. divaricata* zu 6,5 Mikrovilli/ μm bei *P. elegans*. Diese bestätigen damit aber dennoch, dass *S. divaricata* einen weniger dichten Mikrovillisaum besitzt als *P. elegans*. Bei genauerer Betrachtung der Literatur zeigt sich das laut Finch (1975) *Viviparus contectoides* ungefähr 0,13 $\mu\text{g O}_2/\text{h}$ verbraucht. Das bedeutet, dass ungefähr 54-mal so viel Sauerstoff im Meerwasser gelöst ist wie *Viviparus contectoides* benötigt. Auch wenn es

Ebenso wie die Drüsentypen V1 und S5, ist auch der Rest der Epidermisstruktur bei *S. divaricata* und *V. viviparus* an der ventralen Seite des Fußes sehr ähnlich strukturiert (Abb. 22 u. 23). Beide besitzen nur spärlich vorhandene Mikrovilli, dafür aber eine zahlreiche Präsenz von motorischen Zilien. Die elektronendurchlässigeren Vesikel, die vakuolenartig erscheinen, sind jeweils am apikalen Ende der Drüsen angesiedelt, während die eingefalteten, elektronendichteren basal davon lokalisiert sind (Bild 22. u. 23).

sich bei der von Fitch untersuchten Art um eine Süßwasserschnecke handelt, kann man davon ausgehen, dass der Sauerstoffverbrauch von marinen Gastropoden eine ähnliche Größenordnung hat. Umgebungssauerstoff ist demnach für Gastropoden in gut belüfteten Gewässern kein limitierender Faktor.

Das Verringern der Oberfläche durch eine geringere Anzahl an Mikrovilli könnte demnach eine Anpassung an den osmotischen Umgebungsdruck darstellen, um damit das Risiko des Austrocknens durch Wasserverlust an die Umgebung zu verringern.

Es wird deutlich, dass *V. viviparus* im Gegensatz zu den beiden anderen Arten, im betrachteten Bereich keinen Microvillisaum, aber stattdessen zahlreiche Zilien besitzt. Nach Portela (2012) ist das ein Anzeichen für die Fußsohle. Hier wird Adhäsions- und Gleitschleim ausgeschieden und die Zilien verteilen diesen auf die gesamte Sohle und unterstützen die Lokomotion. Mikrovilli zum Stoffaustausch bzw. zur Atmung werden hierbei nicht benötigt.

Interessant ist auch die sehr große Ähnlichkeit der Epithelstruktur von *V. viviparus* inklusive Drüsen, Sekretvesikeln und Zilienabundanz zu jener in Bereichen des Epithels von *S. divaricata*. Beide Schneckenarten leben im mäßig fließenden/umspülten Bereich ihrer Gewässer

(Fortsetzung Bildunterschrift vorangegangene Seite)

und der Extrazelluläre Raum (EZR) lassen sich gut vom Rest des Gewebes abgrenzen (14). Die Maßstabsbalken entsprechen stets 2.5 μm .

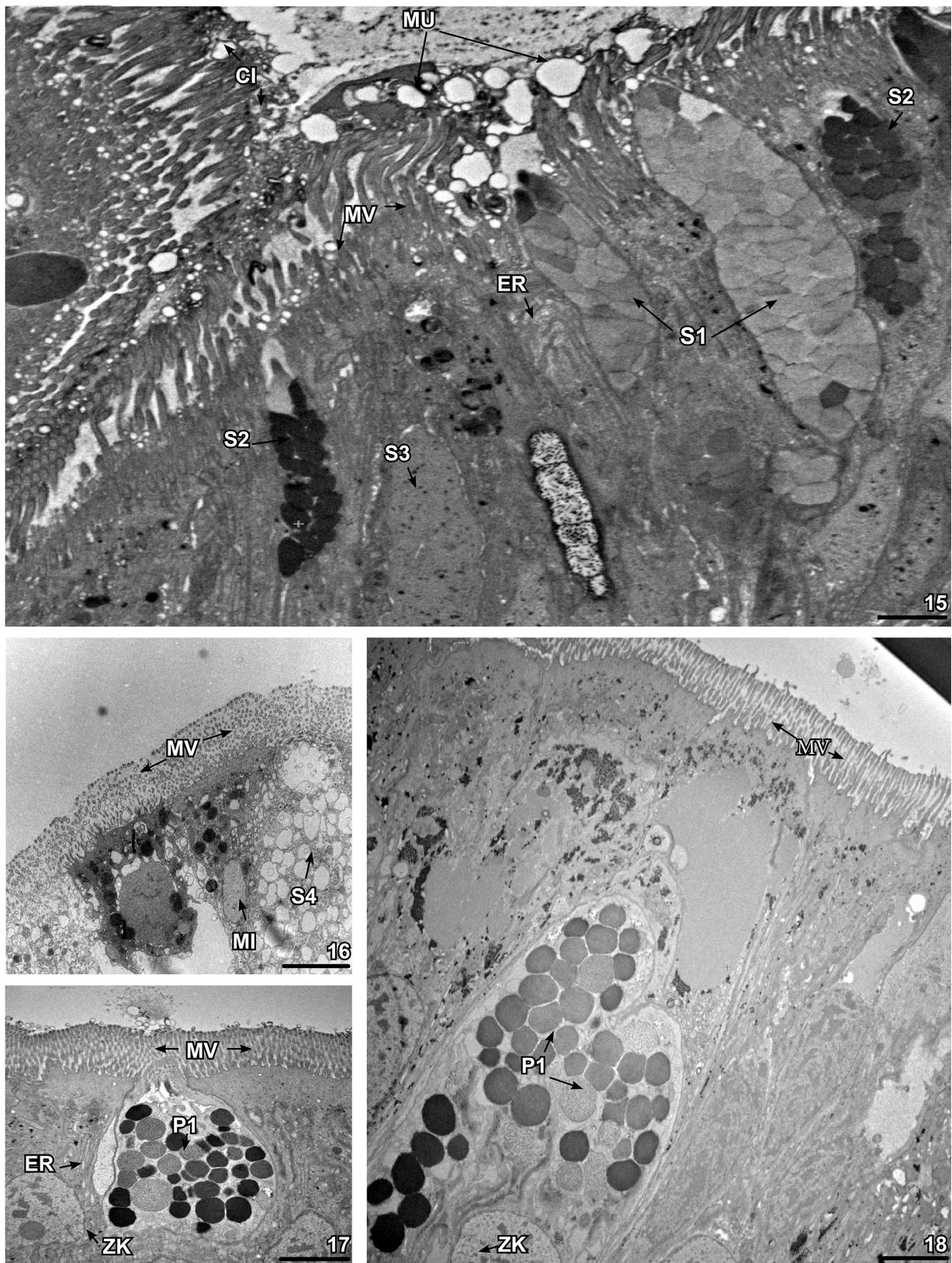


Abb. 15 - 18. Vergleich der Drüsenzellen der untersuchten Arten *S. divaricata* (15, 16) und *V. viviparus* (17, 18); TEM-Aufnahme. Zu sehen ist der Mikrovilisaum (MV), die überragenden Zilien (15) (CI), die aus der Zelle ausgetretenen Schleimvesikel (MU) und die Schleimschicht (15). Die Zellkerne (ZK) sind durch die birnenförmig geformten Drüsen im basalen Teil der Zellen lokalisiert. Ebenfalls sichtbar sind Mitochondrien (MI) und das am Zellkern anliegende Endoplasmatische Retikulum (ER). Es sind von *S. divaricata* 4 Drüsentylen dargestellt (S1 - 4). S1 ist dicht gepackt mit fast polygonal geformten Sekretvesikeln, welche heterogen, jedoch tendenziell elektronendurchlässig sind (15). S2 ist lockerer gepackt mit ellipsoid geformten Vesikeln, die mit deutlich elektronendichtem Material gefüllt sind (15). S3 ist großflächig granulär gefüllt mit einzelnen elektronendichten Teilen (15), während S4 fast transluzente, vakuolenartige Sekretvesikel besitzt (16). Auf Abb. 17 ist sehr deutlich zu erkennen, wie eine Drüsenzelle ihren Inhalt nach außen gibt (P1). Sie ist gefüllt mit sehr heterogen elektronendichten und -durchlässigen Vesikeln, welche eine polygonale Gestalt haben. Die Maßstabsbalken entsprechen stets 2.5 µm.

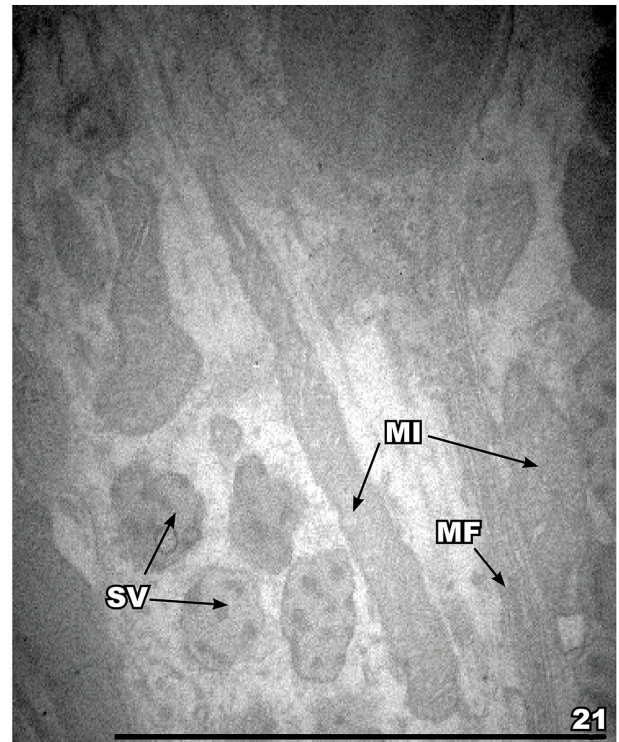
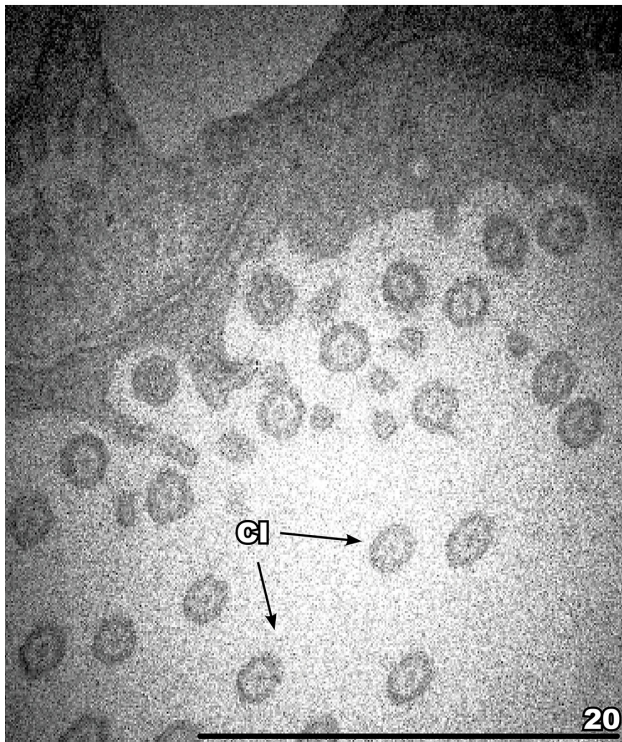
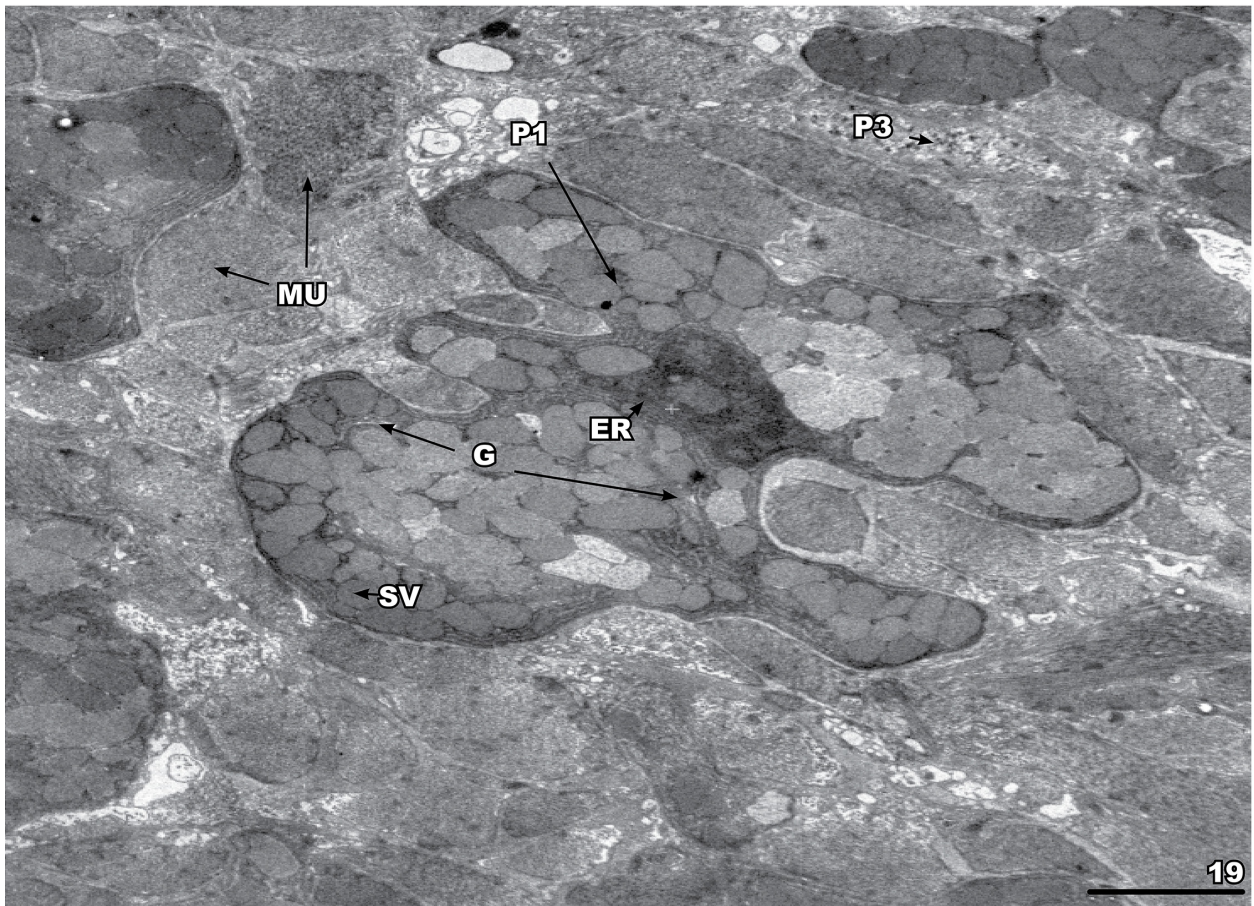


Abb. 19 - 21. TEM-Aufnahmen von subepithelialen Drüsenzellen der Epidermis am Fuß von *S. divaricata* (19) und zwei Detailaufnahmen von *V. Viviparus* (20 u. 21). Auf Abb. 19 Dargestellt ist eine Drüsenzelle (S1) mit äußerst ausgeprägtem Golgi-Apparat (G) und Endoplasmatischem Retikulum (ER) gefüllt mit Sekretvesikeln (SV). Umgeben ist diese von Muskelzellen (MU) und weiteren Drüsenzellen (S1 u. S3). (20) Detailaufnahme von Zilien (CI) im Querschnitt. Deutlich ist die 9x2+2 Mikrotubulstruktur erkennbar. (21) Vergleichsbild der Sekretvesikel (SV) aus dem Drüsentyp V1 mit Mitochondrien (MI). Zwischen den Epithelzellen laufen Muskelfasern (MF). Die Maßstabsbalken entsprechen stets 2.5 µm.

und brauchen daher eine vergleichbare Adhäsionswirkung ihres Schleims. Dies hatten wir schon in unserer Erwartung formuliert, jedoch konnte die bei Greifstorfer (2017) beschriebene größere Vielfaltigkeit der Drüsentypen an der Fußsohle nicht bestätigt werden.

An der ventralen Seite des Fußes wurde nur pro Art jeweils ein Drüsentyp beschrieben, während an der dorsalen Seite von *S. divaricata* die Drüsenzellen S1-4 unterschieden werden konnten. Gesamt gesehen liegt die marine Schnecke *S. divaricata* mit 5 verschiedenen Drüsenzelltypen vor *P. elegans* und *V. viviparus* mit nur jeweils einem. Dies deckt sich mit der Untersuchung von von Byern (2017), nach jener marine Gastropoden im Schnitt mit mehr unterschiedlichen Drüsenzelltypen ausgestattet sind.

Zusätzlich dazu sind die beobachteten Unterschiede auch damit zu erklären, dass der betrachtete Bereich sich bei *V. viviparus* auf die ventrale Seite des Fußes und bei *P. elegans* auf die Tentakel beschränkt hatte, an der weniger Drüsenzellen, dafür mehr Rezeptorzellen vorkommen (Simkiss 1988).

Mittels der REM-Aufnahmen konnte ein Einblick in die Oberflächenstruktur der Epidermis gegeben werden, wobei festgestellt wurde, dass zwischen oder auch über den Zellfortsätzen eine netzartige Struktur ausgebildet ist. Darüber hinaus sind bei *S. divaricata* intakte Schleimtröpfchen sichtbar gewesen, die auch von netzartigen Strukturen umgeben sind. Diese netzartige Struktur haben wir als Schleimschicht interpretiert, da gemäß Deyrup-Olsen, Luchtel und Martin (1983) Vesikel bei Gastropoden intakt ausgeschieden und ihr Inhalt erst über exogene Faktoren freigesetzt wird.

Somit sind die an der Fußsohle ausgeschiedenen Sekretvesikel bei *V. viviparus* und *S. divaricata* vermutlich schon durch Reibung am Boden zerstört worden. Ihr Inhalt wurde daraufhin freigesetzt, ist am Epithel polymerisiert und hat eine netzartige Struktur ausgebildet. Da bei *S. divaricata* die beschriebenen Schleimtröpfchen an der dorsalen Seite des Fußes lagen, sind diese mangels exogener Faktoren größtenteils intakt geblieben.

Fazit

Durch unsere Studien konnten wir feststellen, dass die Mikrovilli-Dichte im Epithel der marinen Schnecke *S. divaricata* geringer als bei der Landschnecke *P. elegans* ausfällt. Damit konnte unsere Erwartung, dass der geringere Sauerstoffgehalt im Meerwasser zu einer Ausbildung eines dichteren Mikrovillisaums führen würde, nicht bestätigt werden. Eventuell wird diese Beobachtung eher durch den gesteigerten osmotischen Druck, dem die marine Schnecke ausgesetzt ist, erklärt.

Darüber hinaus konnte ein fast vollständiges Fehlen von Mikrovilli an der ventralen Seite des Fußes vom Süßwasser-Gastropod *V. viviparus* und der marinen Schnecke *S. divaricata* beschrieben werden. Stattdessen ist dieser Bereich von zahlreichen motorischen Zilien mit der Mikrotubuli-Struktur $9 \times 2 + 2$ besetzt, die die Lokomotion des Tieres unterstützen.

Beim Vergleich dieser zwei Arten ist ebenfalls deutlich geworden, dass die generelle Struktur und im Speziellen die Drüsenzellen V1 und S5 in diesem Bereich sehr ähnlich sind. Das leuchtet ein, wenn man sich die jeweiligen Habitate vor Augen führt. Diese sind bei beiden durch Umspülung von erhöhten Ansprüchen an die Adhäsion am Substrat geprägt.

Wir haben schließlich für *S. divaricata* fünf und für *P. elegans* und *V. viviparus* jeweils einen Drüsenzelltyp mittels ultrastrukturellem Vergleich beschrieben. Dies deckt sich mit Ergebnissen aus der Literatur, die eine größere Vielfaltigkeit bei marinen Gastropoden konstatiert hat.

Eine Aufklärung über die Wirkweise der Bandbreite der Funktionen des Gastropoden-Schleims ist Gegenstand aktueller Forschung, z. B. für biotechnologische oder taxonomische Ansätze.

Für eine wirkliche Vergleichbarkeit der Ergebnisse hätten jedoch bedeutend mehr Schnitte angefertigt und diese auch korrekt kartiert werden müssen. Darüber hinaus wäre eine histochemische Komponente wichtig zur klaren Unterscheidung und Charakterisierung der Drüsenzelltypen und dem Inhalt ihrer Ausscheidungen gewesen. Das würde dann auch weitergehende Schlüsse zu der Funktion der Sekrete im Bezug zum jeweiligen Habitat ermöglichen.

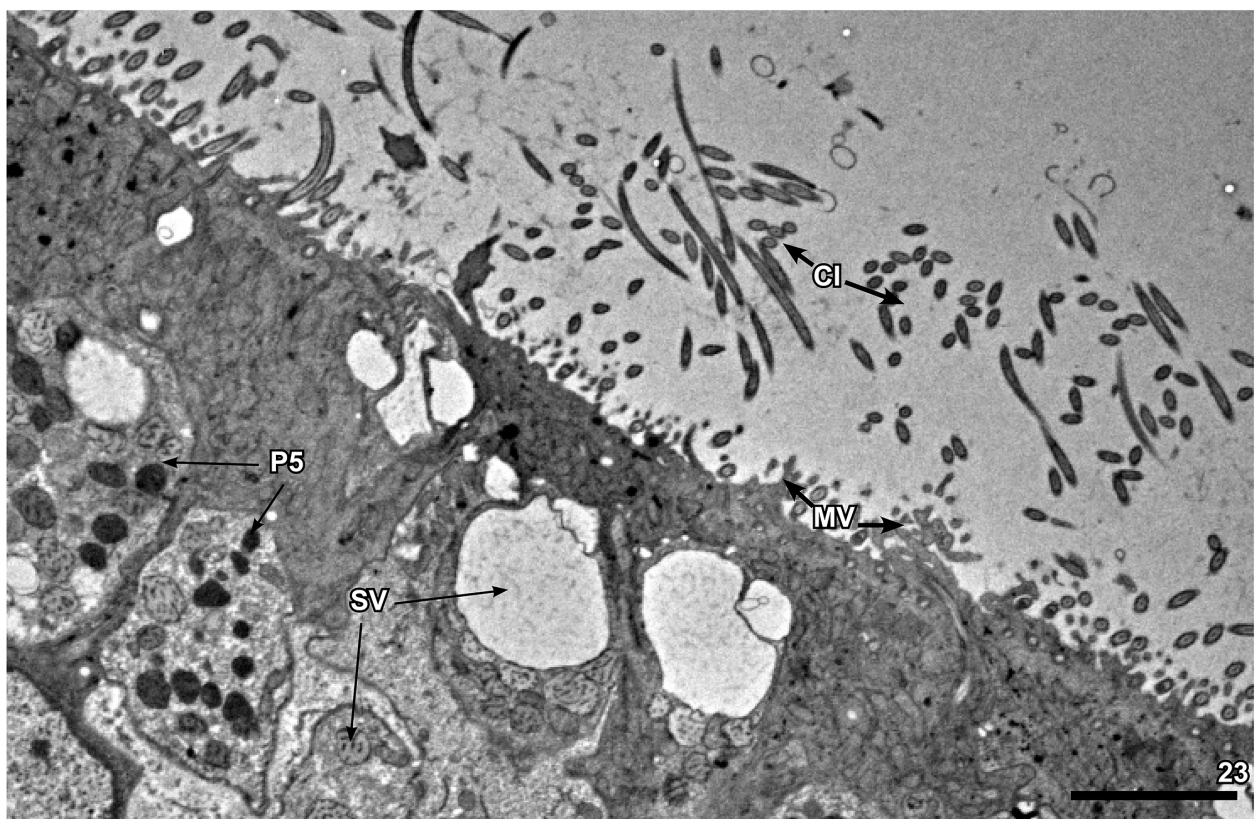
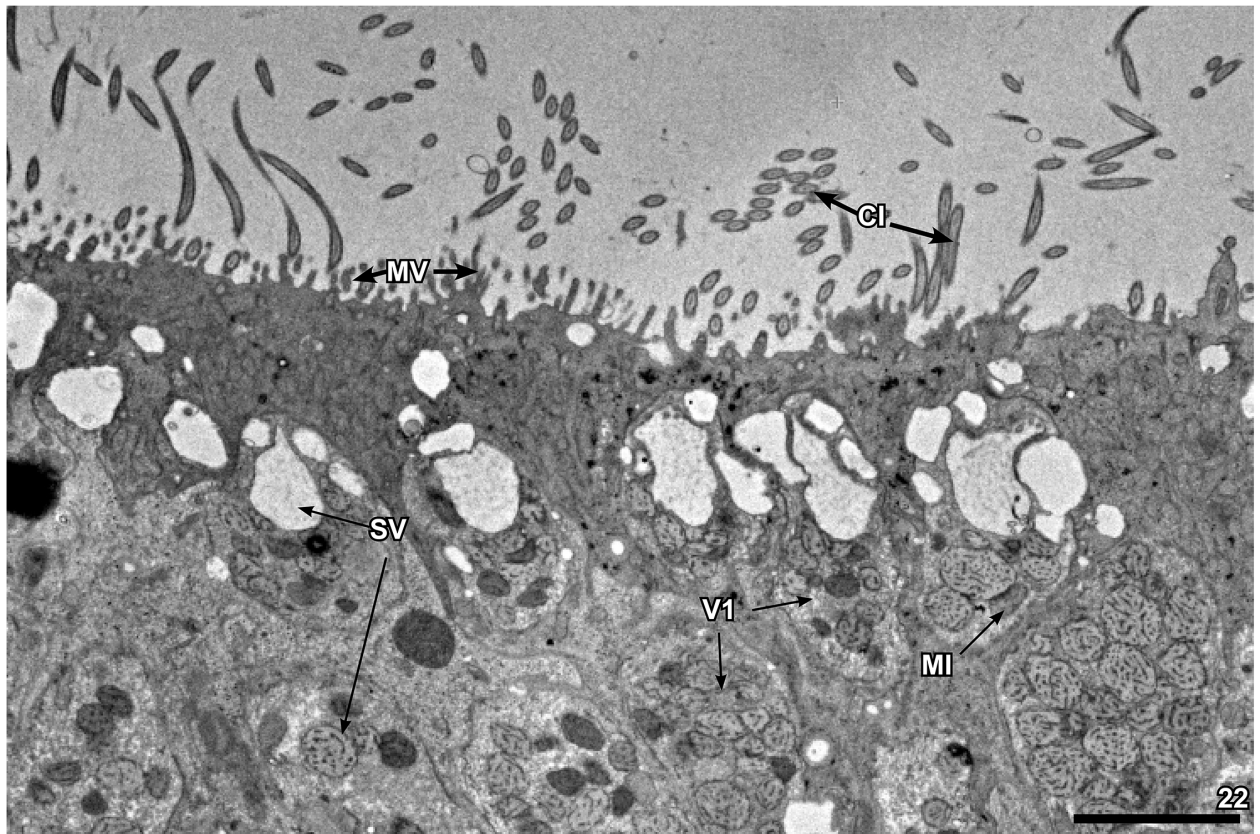


Abb. 22 & 23. Vergleichende Darstellung von TEM-Bildern der Epidermis vom Fuß von jeweils *V. viviparus* (22) und *S. divaricata* (23). Der Mikrovillisaum (MV) ist hier bei beiden reduziert und die Epidermis recht dicht mit langen Zilien (CI) besetzt. Einzelne Mitochondrien (MI) sind zwischen den Sekretvesikeln (SV) der Drüsenzellen erkennbar. Die als S5 (23) bzw. V1 (22) betitelten Drüsen sind ähnlich strukturiert und mit zwei Arten von Vesikeln gefüllt zu sein. Die erste ist apikal lokalisiert mit fast komplett elektronendurchlässigen Material gefüllt, ähnlich wie bei S4. Nur ganz schwach ist bei einigen Vesikeln eine granuläre Struktur zu erahnen. Die andere ist basal lokalisiert und ähnelt einem Mitochondrium, ist aber sehr unregelmäßig eingefaltet und heterogen elektronendicht. Die Maßstabsbalken entsprechen stets 2.5 µm.

Literatur

- R. A. Barr. (1927), „Some Notes on the Mucous and Skin Glands of *Arion ater*.“ Journal of Cell Science 1927 s2-71: 503-525; Online ISSN 1477-9137
- I. Bravo Portela, V. S. Martinez-Zorzano, I. Molist- Perez, and P. Molist García (2012), „Ultrastructure and Glycoconjugate Pattern of the Foot Epithelium of the Abalone *Haliotis tuberculata* (Linnaeus, 1758) (Gastropoda, Haliotidae)“, The Scientific World Journal, vol. 2012, Article ID 960159, <https://doi.org/10.1100/2012/960159>
- Crisp (2009), „Structure and Abundance of Receptors of the Unspecialized External Epithelium of *Nassarius Reticulatus* [Gastropoda, Prosobranchia]“, Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom Volume 51 Issue 4, <https://doi.org/10.1017/S0025315400018026>
- M. S. Davies and S. J. Hawkins (1998), „Mucus from marine molluscs,“ in Advances in Marine Biology V34, pp. 1–71, Academic Press, London, UK, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(08\)60210-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60210-2)
- M. Denny, (1983), „Molecular biomechanics of molluscan mucous secretions.“ Metabolic Biochemistry and Molecular Biomechanics. pp. 431–465 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-751401-7.50017-X>
- D. G. Emery, (1992), „Fine structure of olfactory epithelia of gastropod molluscs.“, Microsc. Res. Tech., 22: 307-324. doi:10.1002/jemt.1070220402
- M. C. Faccioni, Heuser, D. M. Zancan, C. Q. Lopes and M. Achaval, (1999), „The pedal muscle of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata): an ultrastructure approach.“, Acta Zoologica, 80: 325-337. doi:10.1046/j.1463-6395.1999.00029.x
- Fitch, D. D. (1975), „Oxygen consumption in the prosobranch snail *Viviparus contectoides* (Mollusca: Gastropoda)–I. Effects of weight and activity.“, Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 51(4): 815-820. [http://dx.doi.org/10.1016/0300-9629\(75\)90059-6](http://dx.doi.org/10.1016/0300-9629(75)90059-6)
- P. Glöer (2002) „Die Tierwelt Deutschlands. Mollusca I Süßwassergastropoden Nord- und Mitteleuropas Bestimmungsschlüssel, Lebensweise, Verbreitung.“, 2. neubearb. Aufl., 327 S., ConchBooks, Hackenheim 2002 ISBN 3-925919-60-0
- J. B. Graham; „Ecological and Evolutionary Aspects of Integumentary Respiration: Body Size, Diffusion, and the Invertebrata“, Integrative and Comparative Biology, Volume 28, Issue 3, 1 August 1988, Pages 1031–1045, <https://doi.org/10.1093/icb/28.3.1031>
- S. Greistorfer, W. Klepal, N. Cyran, A. Gugumuck, L. Rudoll, J. Suppan, J. von Byern (2017), „Snail mucus – glandular origin and composition in *Helix pomatia*“, Zoology, Volume 122, 2017, Pages 126-138, ISSN 0944-2006, <https://doi.org/10.1016/j.zool.2017.05.001>.
- J. M. Poutiers, (1998). „Gastropods in: FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes: The living marine resources of the Western Central Pacific“ Volume 1. Seaweeds, corals, bivalves and gastropods. Rome, FAO, 1998. page 399. ISBN 92-5-104051-6
- T. A. Ryder and I. D. Bowen (1977), „Endocytosis and aspects of autophagy in the foot epithelium of the slug *Agriolimax reticulatus* (Muller),“ Cell and Tissue Research, vol. 181, no. 1, pp. 129–141, 1977. PMID: 880619
- K. Simkiss (1988) , „Molluscan skin (excluding cephalopods),“ in The Mollusca: Form and Function, E. R. Trueman and M. R. Clarke, Eds., pp. 11–35, Academic Press, London, UK, 1988.
- L. C. Schlichter, „Ion relations of haemolymph, pallial fluid, and mucus of *Lymnaea stagnalis*“, Canadian Journal of Zoology, 1981, 59(4): 605-613, <https://doi.org/10.1139/z81-089>
- J. von Byern, N. Cyran, W. Klepal, L. Rudoll, J. Suppan, S. Greistorfer (2017) „The structure of the cutaneous pedal glands in the banded snail *Cepaea hortensis* (Müller, 1774).“, Journal of Morphology. 2018;279:187–198. <https://doi.org/10.1002/jmor.20763>
- W. Wenz (1923) „Gastropoda extramarina tertiaria“, Fossilium catalogus, 1 Animalium, 17 + 23: 1-1862, Berlin 1923 (S. 1807).

G. Wondrak, (2012). „Monotypic gland-cell regions on the body surface of two species of *Arion*: Ultrastructure and lectin-binding properties. “ Journal of Molluscan Studies, 78, 364–376. <https://doi.org/10.1093/mollus/ey024>